

Université de Sherbrooke

**Élucidation du rôle et du mécanisme d'action de la protéine Cuf2 lors de la méiose
chez la levure *Schizosaccharomyces pombe***

Par

Raphaël Ioannoni

Programme de biochimie

Thèse présentée à la Faculté de médecine et des sciences de la santé
en vue de l'obtention du grade de *philosophiae doctor* (Ph.D.)
en biochimie

Sherbrooke, Québec, Canada

(septembre 2016)

Membres du jury d'évaluation :

Simon Labbé, Biochimie

François Bachand, Biochimie

François Boudreau, Anatomie et biologie cellulaire

Vincent Archambault, Biochimie et médecine moléculaire, Faculté de médecine, Université
de Montréal

© Raphaël Ioannoni, 2016

RÉSUMÉ

Élucidation du rôle et du mécanisme d'action de la protéine Cuf2 chez la levure *Schizosaccharomyces pombe*

Par
Raphaël Ioannoni
Programme de Biochimie

Thèse présentée à la Faculté de médecine et des sciences de la santé en
vue de l'obtention du diplôme de *philosophiae doctor* (Ph.D.)
en biochimie, Faculté de médecine et des sciences de la santé, Université de
Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada, J1H 5N4

Chez *Schizosaccharomyces pombe*, le cycle méiotique est le mode de division cellulaire spécialisé qui permet la formation d'ascospores résistantes à différents stress lorsque les conditions environnementales ne sont pas propices à la multiplication cellulaire. Lors de mes travaux de thèse, mes objectifs consistaient à caractériser le rôle et le mécanisme d'action de la protéine Cuf2 lors du cycle méiotique chez *S. pombe*. Mes résultats ont montré que le gène *cuf2*⁺ était exprimé exclusivement lors des divisions méiotiques et que la protéine se co-localisait de manière constitutive avec le matériel génétique. De plus, mes résultats ont dévoilé que Cuf2 participait à l'activation et à la répression de plusieurs gènes méiotiques selon un mécanisme de nature transcriptionnelle en s'associant spécifiquement avec leur région promotrice. Par la suite, mes résultats ont mis en évidence que Cuf2 interagissait physiquement avec Mei4, un facteur de transcription méiose-spécifique, au noyau des cellules méiotiques. Notamment, mes résultats ont montré que la présence de Mei4 et de son motif de liaison à l'ADN dénommé FLEX étaient nécessaires afin que Cuf2 puisse s'associer au promoteur de son gène cible *fzr1*⁺ afin d'en activer l'expression. L'ensemble de mes résultats indiquent que Cuf2 et Mei4 interagissent aux promoteurs de certains gènes lors des divisions méiotiques afin d'en co-activer l'expression.

D'ailleurs, mes résultats ont également montré que la fonction de Cuf2 était importante à la formation d'ascospores et à leur viabilité ; en absence de Cuf2, la majorité des ascospores présentent diverses aberrations et plus de la moitié d'entre elles sont non-viables. Globalement, mes résultats démontrent que Cuf2 est un régulateur critique de l'expression génique lors du cycle méiotique et que cette fonction est essentielle à la sporulation chez *S. pombe*.

Mots clés : *Schizosaccharomyces pombe*, cycle méiotique, sporulation, transcription, chromatine, spore, Cuf2.

TABLE DES MATIÈRES

Résumé	ii
Table des matières	iii
Liste des figures	vi
Liste des tableaux	viii
Liste des abréviations	ix
 Introduction	 11
1. Présentation de l'organisme modèle <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	11
1.1. Phylogénie et caractéristiques générales.....	11
1.2. L'utilité des organismes modèles en recherche.....	12
1.3. <i>S. pombe</i> comme modèle d'étude.....	13
2. Le cycle vital de la levure à fission.....	14
2.1. But et caractéristiques de la croissance végétative.....	15
2.2. But et caractéristiques de la sporulation.....	15
2.3. Principes de régulation des cycles cellulaires mitotique et méiotique.....	17
2.4. La croissance végétative.....	20
2.4.1. Phases du cycle mitotique.....	20
2.4.2. Étapes de la mitose.....	21
2.4.3. Régulation du cycle mitotique et points de contrôle.....	22
2.5. La sporulation.....	24
2.5.1. Le statut nutritionnel et la régulation de Ste11.....	25
2.5.1.1. Régulation négative par la présence d'azote.....	26
2.5.1.2. Régulation positive par l'absence d'azote.....	27
2.5.2. Croisement entre deux cellules de type sexuel opposé.....	29
2.5.2.1. Activation de Ste11 par les phéromones sexuelles.....	30
2.5.2.2. Formation du zygote diploïde.....	31
2.5.2.3. Méiose zygotique vs azygotique.....	32
2.5.3. Cascade d'initiation du cycle méiotique.....	33
2.5.4. Étapes du cycle méiotique et de la sporulation.....	33

2.5.5. Rôle de la kinase Pat1 dans la régulation du cycle vital chez <i>S. pombe</i>	36
2.5.6. Synchronisation des cellules méiotiques via le système <i>pat1-114</i>	37
2.5.7. <i>S. pombe</i> comme modèle d'étude du cycle méiotique.....	38
2.5.8. Étude du transcriptome méiotique chez <i>S. pombe</i>	39
2.5.9. Vagues d'expression génique lors du cycle méiotique.....	41
2.5.9.1. Les gènes de la réponse au changement nutritionnel (1 ^{re} vague).....	44
2.5.9.2. Les gènes précoces (2 ^e vague).....	45
2.5.9.3. Les gènes intermédiaires (3 ^e vague).....	47
2.5.9.4. Les gènes tardifs (4 ^e vague).....	53
3. Découverte de la protéine Cuf2 chez <i>S. pombe</i>	54
3.1. L'importance de l'ion de cuivre chez les organismes vivants.....	54
3.2. L'homéostasie du Cu chez les eucaryotes.....	55
3.2.1. La régulation de l'homéostasie du Cu chez <i>S. cerevisiae</i>	56
3.2.2. La régulation de l'homéostasie du Cu chez <i>S. pombe</i>	57
4. Préambule, hypothèse et objectifs.....	60
Article 1.....	61
Résumé.....	61
Abstract.....	64
Introduction.....	65
Material and methods.....	68
Results.....	74
Discussion.....	104
References.....	109
Acknowledgments.....	117
Article 2.....	118
Résumé.....	118
Abstract.....	121
Introduction.....	122
Material and methods.....	126

Results.....	135
Discussion.....	158
Acknowledgments.....	163
References.....	164
Discussion.....	172
1. Phénotypes associés à la perte de Cuf2 dans les cellules méiotiques.....	172
1.1. Explication des phénotypes observés en absence de Cuf2.....	173
1.1.1. FSM anormale : explications possibles.....	175
1.1.2. Production anormale d'ascospores : explications possibles.....	177
1.1.3. Diminution de la viabilité des ascospores.....	179
1.1.4. Troisième division méiotique aberrante.....	180
2. Mécanisme par lequel Cuf2 régule l'expression génique.....	182
2.1. Récapitulation des données de la 1 ^{re} publication (2012).....	183
2.2. Identification d'une nouvelle cible de Cuf2 : préambule au 2 ^e manuscrit.....	184
2.3. Récapitulation des données de la 2 ^e publication - 1 ^{re} partie.....	184
2.3.1. Contrôle transcriptionnel vs post-transcriptionnel de l'expression des gènes intermédiaires.....	186
2.4. Récapitulation des données de la 2 ^e publication - 2 ^e partie.....	187
2.4.1. Liaison de Cuf2 à l'ADN et identification d'une séquence régulatrice.....	190
2.4.2. Identification du régulon de Cuf2.....	194
2.4.3. Recrutement de Cuf2 à la chromatine et interaction avec Mei4.....	194
2.4.4. Mécanisme par lequel Cuf2 régule la transcription.....	197
2.4.5. Fonction antagoniste de Cuf2 sur la transcription.....	201
Conclusion.....	204
Remerciements.....	205
Liste des références.....	206

LISTES DES FIGURES

Introduction

Figure 1. Cycle vital de la levure <i>S. pombe</i>	17
Figure 2. Fusion entre deux cellules de sexe opposé chez <i>S. pombe</i>	30
Figure 3. Vagues d'expression génique lors des différentes étapes du cycle méiotique chez <i>S. pombe</i>	42

Discussion

Figure 1. Modèle de régulation positive exercée par Cuf2 sur l'expression de <i>fzr1</i> ⁺ et terminaison des divisions méiotiques.....	197
Figure 2. Modèle par lequel Cuf2 réprime l'expression du gène <i>wtf13</i> ⁺ et régulation des gènes intermédiaires.....	201

Résultats

Article 1

Figure 1. <i>Comparison of Cuf2 with the S. pombe copper metalloregulatory transcription factor Cuf1</i>	75
Figure 2. <i>Assessment of the mRNA and protein steady-state levels of Cuf2 during Meiosis</i>	78
Figure 3. <i>cuf2</i> ⁺ gene expression is Mei4-dependent.....	79
Figure 4. <i>Analysis of Cuf2-GFP localization during both meiosis and sporulation</i>	81
Figure 5. <i>Effect of cuf2Δ/cuf2Δ deletion on the expression of S. pombe genes</i>	84
Figure 6. <i>cuf2Δ and meu5Δ gene disruptions have opposite effects on common meiosis-specific genes</i>	98
Figure 7. <i>The cuf2Δ/cuf2Δ mutant is defective in FSM formation</i>	102
Figure 8. <i>cuf2Δ/cuf2Δ mutant cells display reduced spore viability</i>	104

Article 2

Figure 1. <i>Cuf2 coordinates timely expression of fzr1</i> ⁺ and <i>wtf13</i> ⁺ during meiosis.....	137
--	-----

Figure 2. <i>Cuf2</i> interacts with <i>fzr1</i> ⁺ and <i>wtf13</i> ⁺ promoters mostly in middle-phase meiosis.....	139
Figure 3. Distribution of <i>Cuf2</i> -occupied regions in chromatin at <i>fzr1</i> ⁺ and <i>wtf13</i> ⁺ loci.....	141
Figure 4. Effect of the presence or absence of <i>Cuf2</i> on RNA polymerase II chromatin occupancy at <i>fzr1</i> ⁺ and <i>wtf13</i> ⁺ loci.....	143
Figure 5. <i>Cuf2</i> affects RNA polymerase II chromatin occupancy at <i>fzr1</i> ⁺ and <i>wtf13</i> ⁺ genes.....	145
Figure 6. Effect of <i>mei4Δ/mei4Δ</i> deletion on the expression of genes that are under the control of <i>Cuf2</i>	148
Figure 7. Loss of <i>Mei4</i> abrogates <i>in vivo</i> chromatin binding of <i>Cuf2</i>	150
Figure 8. <i>Cuf2</i> and <i>Mei4</i> co-expressed in cells proliferating in mitosis interacted with each other.....	153
Figure 9. Two FLEX elements in the <i>fzr1</i> ⁺ promoter are required for maximal binding of <i>Cuf2</i> to chromatin and its ability to co-regulate <i>fzr1</i> ⁺ transcription.....	156

LISTE DES TABLEAUX

Résultats

Article 1

Table 1. <i>S. pombe</i> strains used in this study.....	68
Table 2. Riboprobes used to detect steady-state levels of transcripts.....	71
Table S1. List of genes that showed elevated expression (averaging ≥ 1.5 -fold) in a <i>cuf2</i> Δ / <i>cuf2</i> Δ mutant (<i>pat1-114</i> / <i>pat1-114</i> synchronized cells).....	85
Table S2. List of middle-phase meiotic genes that showed elevated expression (averaging ≥ 1.5 -fold) in a <i>cuf2</i> Δ / <i>cuf2</i> Δ mutant (<i>pat1-114</i> / <i>pat1-114</i> synchronized cells).....	86
Table S3. List of genes that showed elevated expression (averaging ≥ 1.5 -fold) in both <i>cuf2</i> Δ / <i>cuf2</i> Δ and <i>meu5</i> Δ / <i>meu5</i> Δ mutants (<i>pat1-114</i> / <i>pat1-114</i> synchronized cells).....	98
Table S4. List of genes that showed elevated expression (averaging ≥ 1.5 -fold) in a <i>cuf2</i> Δ / <i>cuf2</i> Δ mutant (<i>pat1-114</i> / <i>pat1-114</i> synchronized cells).....	87
Table S5. List of genes that show reduced expression in a <i>cuf2</i> Δ / <i>cuf2</i> Δ mutant (<i>pat1-114</i> / <i>pat1-114</i> synchronized cells).....	94

Article 2

Table 1. <i>S. pombe</i> strains used in this study.....	126
Table 2. Riboprobes used to detect steady-state levels of transcripts.....	131
Table 3. Primers used for qPCR analyses in ChIP experiments.....	132

LISTE DES ABBRÉVIATIONS

A : adénosine

ADN: acide désoxyribonucléique

AMPC: adénosine monophosphate cyclique

Arg: arginine

ARN: acide ribonucléique

ARNm: acide ribonucléique messenger

APC: *anaphase promoting complex*

ATF: *activating transcription factor*

BiFC: bimolecular fluorescence complementation

bZIP: *basic leucine zipper*

C: cytidine

Cdk: kinase cycline-dépendante

CoIP: co-immunoprécipitation

Ctr: *copper transporter*

Cu: cuivre

Cys: cystéine

DUF: *domain of unknown function*

DSR: *determinant of selective removal*

E. coli: *Escherichia coli*

e.g.: *exempli gratia*

Fkh: *forkhead*

FLEX: *FREAC-like element of spo6*

FMS: formation de la membrane des spores

fzr1⁺: *fizzy-related 1*

G₁ ou G₂: *gap 1* ou *2*

G: guanosine

HA₄: hémagglutinine

His: histidine

HMG: *high mobility group*

HMGA: *high mobility group A*

HMGB: *high mobility group B*

i.e.: *id est*

kDa: kilodalton

Lys: lysine

M: mitotique

MI: méiose I

MII: méiose II

MAPK: *mitogen-activated protein kinase*

MBF: *MluI binding factor*

MBP: *maltose-binding peptide*

ARN pol II: ARN polymérase II

RRM: *RNA recognition motif*

S: synthèse

S. cerevisiae: *Saccharomyces cerevisiae*

S. pombe: *Schizosaccharomyces pombe*

Ser: sérine

T: thymidine

Thr: thréonine

TOR: *target of rapamycin*

TORC1: *target of rapamycin complex 1*

μm: micromètre

wtf: *with tf* ou *with transposon of fission yeast*

INTRODUCTION

1. Présentation de l'organisme modèle *Schizosaccharomyces pombe*

1.1. Phylogénie et caractéristiques générales

Les levures sont des micro-organismes unicellulaires qui font partie du règne eucaryotique des mycètes (*fungi*), au même titre que les moisissures et les champignons (Hoffman *et al.*, 2015). Selon certaines caractéristiques morphologiques, les mycètes se répartissent au sein de sept sous-embranchements (Woese et Fox, 1977). Deux de ces sous-embranchements, les ascomycètes et les basidiomycètes, forment le sous-règne des *dikarya* et renferment toutes les espèces de levures ayant la capacité de former des cellules binucléées, les dicaryons (Hibbett *et al.*, 2007). Ce stade cellulaire transitoire survient lors du processus de différenciation qui permet à deux cellules de types sexuels opposés de fusionner et de produire des entités plus résistantes, les spores (Egel, 2004). La levure *Schizosaccharomyces pombe* est un ascomycète qui, lors de ce processus de différenciation, produit des ascospores, c'est-à-dire des spores qui sont enveloppées par groupe de quatre dans un asque, un sac spécialisé qui favoriserait leur dissémination (Egel, 2004, Hibbett *et al.*, 2007).

La levure *S. pombe* est un organisme saprophytique qui doit acquérir les nutriments dont elle a besoin (e.g. sources de carbone, d'azote et de minéraux) à partir de matière organique morte ou en décomposition (Whittaker, 1969). Sa survie est donc hautement dépendante des nutriments dont elle dispose dans son milieu environnemental. Communément aux autres mycètes, la membrane plasmique de *S. pombe* est entourée d'une paroi cellulaire constituée de polymères de sucres ramifiés et de protéines glycosylées. Cette paroi, à la fois souple et rigide, la protège de son environnement tout en assurant l'intégrité de sa structure cellulaire (Egel, 2004, Hoffman *et al.*, 2015).

S. pombe se présente sous une forme linéaire et cylindrique, d'un diamètre d'environ 3 μm . Elle croît exclusivement au niveau de ses extrémités et son expansion varie

de 8 à 15 μm de longueur en fonction des nutriments dont elle dispose et du stade cellulaire dans lequel elle se trouve (Fantes, 1989, Nurse, 1975, Nurse *et al.*, 1976). *S. pombe* prolifère normalement à l'état haploïde et se divise par scission via la formation d'un septum à partir de son centre (Hoffman *et al.*, 2015, Mitchison, 1990). C'est précisément cette caractéristique qui lui a valu le surnom de levure « à fission » ou « fissipare ». D'ailleurs, ce type de division diffère grandement de celui employé par la levure *Saccharomyces cerevisiae*, qui elle, se divise via la formation d'une excroissance asymétrique appelée « bourgeonnement » (Fantes, 1989, Forsburg et Nurse, 1991). Le génome de *S. pombe*, entièrement séquencé depuis 2002, est réparti sur 3 chromosomes et totalise 5125 gènes codant pour des protéines (Hoffman *et al.*, 2015, Wood *et al.*, 2002).

1.2. L'utilité des organismes modèles en recherche

La recherche fondamentale s'est toujours appuyée sur l'utilisation d'organismes génétiquement plus simples et plus facilement manipulables dits « modèles ». Ceux-ci ont facilité la compréhension des bases moléculaires de divers processus biologiques que l'on retrouve chez les organismes plus complexes dits « supérieurs » (Hedges, 2002). Cette stratégie de recherche tire avantage du fait qu'au cours de l'évolution, une multitude de processus biologiques ont été conservés à travers les espèces. La drosophile *Drosophila melanogaster* ainsi que le nématode *Caenorhabditis elegans* sont des exemples notoires de modèles expérimentaux ayant facilité la compréhension de plusieurs phénomènes biologiques importants tels que l'hérédité et le développement embryonnaire (Hedges, 2002, Lesch et Page, 2012).

Les levures *S. pombe* et *S. cerevisiae* représentent également de précieux organismes modèles. En plus d'être totalement inoffensives pour l'humain, elles possèdent une multitude de gènes et de processus cellulaires aussi présents chez les eucaryotes supérieurs (Li *et al.*, 2010, Wood, 2006, Wood *et al.*, 2002). Grâce à leur utilisation, des percées majeures ont été réalisées dans différents domaines, en particulier dans celui de la régulation du cycle cellulaire (Fantes, 1989, Forsburg et Nurse, 1991). Au cours de la dernière décennie, l'impact de ces découvertes est devenu indiscutable. En 2001, le

prestigieux prix Nobel en physiologie ou médecine a été décerné aux généticiens Paul Nurse (*S. pombe*) et Leland H. Hartwell (*S. cerevisiae*) ainsi qu'au biochimiste Tim Hunt (embryons d'oursins de mer) pour leur découverte de la régulation du cycle cellulaire par les cyclines et les kinases cycline-dépendantes (Hoffman *et al.*, 2015).

S. pombe et *S. cerevisiae* offrent plusieurs avantages qui en font aujourd'hui des organismes modèles assez répandus (Sabatinos et Forsburg, 2010). Leur temps de génération est relativement court (deux à quatre heures) et leur culture se fait à partir de milieux nutritifs simples et peu coûteux, ce qui permet d'obtenir de grandes quantités de cellules en peu de temps. De plus, divers outils moléculaires ont été développés et perfectionnés de sorte qu'on peut facilement déléter, muter, étiqueter ou contrôler l'expression d'un ou de plusieurs gènes simultanément (Sabatinos et Forsburg, 2010). Leur génome haploïde qui est entièrement séquencé facilite les études génétiques visant à caractériser le rôle d'une protéine ou d'un mécanisme impliquant plusieurs acteurs. L'utilisation de *S. pombe* et *S. cerevisiae* s'est donc établie dans l'étude de différents processus biologiques conservés tels que la réplication de l'ADN, la recombinaison homologe, la transduction de signaux, l'homéostasie des métaux et la réparation des dommages à l'ADN (Forsburg, 2005, Hoffman *et al.*, 2015).

1.3. *S. pombe* comme modèle d'étude

Bien que *S. cerevisiae* occupe toujours une place prépondérante en recherche fondamentale, *S. pombe* a énormément gagné en popularité au cours des trente dernières années. On rapporte que le nombre moyen d'études employant *S. pombe* comme support expérimental est passé d'une cinquantaine dans les années 1980, à plus de 450 en 2010 (Hoffman *et al.*, 2015). Ce phénomène est en partie attribuable au fait que *S. pombe* partage plus de similarités que *S. cerevisiae* avec les eucaryotes supérieurs (Aravind *et al.*, 2000, Wood, 2006). Par exemple, *S. pombe* possède les composantes principales du système d'interférence à l'ARN (e.g. Ago1, Dcr1 et Rdp1), tandis que celles-ci sont absentes chez *S. cerevisiae* (Wood *et al.*, 2002). De plus, l'incidence des introns est beaucoup plus forte chez *S. pombe* (présents dans 40% des gènes) que chez *S. cerevisiae* (5%) (Wood *et al.*, 2002).

Les trois chromosomes de *S. pombe* possèdent de longs centromères structurés de même que des structures hétérochromatiniennes complexes similaires à celles retrouvées chez les vertébrés, ce qui n'est pas le cas chez *S. cerevisiae* (Hoffman *et al.*, 2015). C'est pourquoi la levure à fission s'est établie comme modèle de choix dans l'étude des mécanismes moléculaires intervenant dans l'interférence à l'ARN, la maturation des ARNm, le fonctionnement des centromères et le remodelage de la chromatine (Aravind *et al.*, 2000, Hoffman *et al.*, 2015, Wood, 2006).

Cette montée en popularité fait en sorte qu'aujourd'hui, une masse importante d'information découle d'expériences réalisées chez *S. pombe*. Seulement 850 protéines ont toujours un rôle inconnu, tandis que 2154 sont expérimentalement caractérisées et 2050 détiennent un rôle prédit par homologie de séquence (Hoffman *et al.*, 2015). Le transcriptome de *S. pombe* a été caractérisé à différents stades des cycles cellulaires (mitotique et méiotique) ainsi qu'en réponse à plusieurs stress, tels que le choc osmotique, le stress oxydatif et les dommages à l'ADN (Bahler, 2005, Chen *et al.*, 2003, Mata *et al.*, 2002, Rustici *et al.*, 2004). Certaines études ont permis la caractérisation du phosphoprotéome (i.e. tous les événements de phosphorylation sur le protéome) et de l'orféome (i.e. la localisation cellulaire de toutes les protéines codées par le génome) (Carpy *et al.*, 2014, Matsuyama *et al.*, 2006). Au fil de leur publication, ces résultats sont intégrés dans une base de données facilement accessible via l'interface web *Pombase.org*. Dans son ensemble, *S. pombe* représente donc une solide plateforme qui permet l'étude et la compréhension fondamentale de processus biologiques à la base du fonctionnement de la cellule eucaryotique.

2. Le cycle vital de la levure à fission

Le cycle vital d'un organisme correspond à la succession d'événements qui composent sa vie, de sa naissance jusqu'à la génération de sa descendance (Lodish et Darnell, 2000). Le cycle vital de *S. pombe* est composé de deux types de reproduction qui sont mutuellement exclusifs, soit la croissance végétative et la sporulation (Egel, 2004, Fantes, 1989). Chez *S. pombe*, c'est l'abondance de certains nutriments, en particulier les

sources assimilables d'azote, qui favorise un mode de reproduction au détriment de l'autre (Egel, 2004, Hayles et Nurse, 1992).

2.1. But et caractéristiques de la croissance végétative

En présence d'azote, *S. pombe* se reproduit en employant la croissance végétative (Egel, 2004, Forsburg, 2005). Ce mode de reproduction asexué permet à la levure de métaboliser les nutriments présents dans son milieu de manière indépendante (i.e. sans l'aide d'une autre cellule) afin de se multiplier via le cycle cellulaire mitotique (Norbury et Nurse, 1992, Vermeulen *et al.*, 2003). Comme chez tous les eucaryotes, le cycle mitotique permet à une cellule « mère » de dupliquer son génome et de donner une copie de ce dernier à une cellule « fille » (Lodish et Darnell, 2000). Par conséquent, la progéniture engendrée au moyen de la croissance végétative est génétiquement identique à celle de la cellule mère (Lodish et Darnell, 2000). Selon les conditions (e.g. température, niveau d'oxygénation, abondance de glucose), *S. pombe* met en moyenne trois heures afin de compléter un cycle mitotique complet (Forsburg, 2005). Si les sources assimilables d'azote demeurent suffisantes pour permettre à la cellule de produire les molécules nécessaires à sa croissance, celle-ci se multipliera continuellement via des rondes successives de cycle mitotique (Forsburg, 2005). La croissance végétative permet donc à *S. pombe* de proliférer (à l'état haploïde) et représente un moyen rapide et optimal d'engendrer une descendance viable (Egel, 2004, Hayles et Nurse, 1992).

2.2. But et caractéristiques de la sporulation

En absence d'azote, *S. pombe* entre dans un processus de différenciation qui permet à deux cellules de type sexuel opposé de fusionner et de combiner leur génome afin de former un zygote diploïde (Egel, 2004, Egel et Egel-Mitani, 1974). Ce zygote entrera automatiquement dans le cycle cellulaire méiotique afin de produire quatre ascospores haploïdes (Egel, 2004, Merlini *et al.*, 2013).

Chez les mammifères, le cycle méiotique est le type de division cellulaire spécifiquement employé par les cellules germinales afin de produire les gamètes haploïdes mâles (spermatozoïdes) ou femelles (ovules) (Cooke et Saunders, 2002, Handel et Schimenti, 2010). Chez *S. pombe*, le cycle méiotique est plutôt un mode de division cellulaire alternatif qui permet aux cellules de survivre à des conditions environnementales dans lesquelles la croissance végétative devient très difficile, voire impossible (Egel, 2004, Merlini *et al.*, 2013). En effet, au terme de la sporulation, le métabolisme des ascospores est réduit au minimum de sorte que les nutriments normalement essentiels, tel que l'azote, ne sont plus critiques à la survie de l'organisme (Egel, 2004, Hayles et Nurse, 1992, Mata *et al.*, 2002, Merlini *et al.*, 2013). De plus, la paroi plus compacte et imperméable de l'ascospore lui permet de résister à une batterie de stress (e.g. choc de température, choc osmotique) et de petites molécules qui mettraient normalement la vie d'une cellule végétative en danger (Egel, 2004, Yamamoto, 1996).

Lors du cycle méiotique, la duplication du génome est suivie d'une étape de recombinaison homologue qui permet aux chromosomes d'échanger une partie de leur matériel génétique, générant ainsi de nouvelles combinaisons uniques de gènes (Lodish et Darnell, 2000). Contrairement à la croissance végétative, la progéniture engendrée au moyen de la sporulation sera donc génétiquement différente de celle des parents (Cooke et Saunders, 2002). Dépendamment des conditions, la totalité du processus de différenciation sexuelle qui aboutit à la production des ascospores peut s'étendre de quelques heures (10 à 12 h) à quelques jours (2 à 3 jours) (Sabatinos et Forsburg, 2010). Lorsque les sources assimilables d'azote redeviennent suffisantes pour permettre la croissance végétative, les ascospores ont la capacité de germer, c'est-à-dire de quitter leur stade de dormance et de proliférer à nouveau (Egel, 2004). Chez *S. pombe*, la sporulation représente donc un moyen adaptatif de survie face à des conditions dans lesquelles la multiplication cellulaire mettrait en danger la survie d'une population (Sabatinos et Forsburg, 2010).

Sporulation

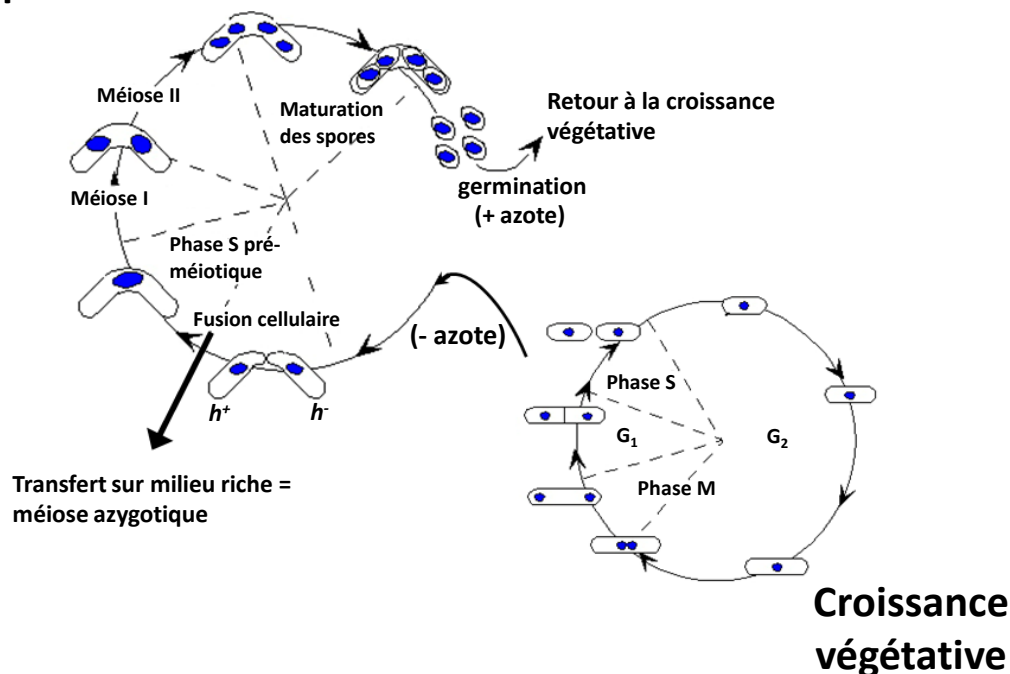


Figure 1. Cycle vital de la levure *S. pombe*. Schématisation morphologique des stades principaux de la sporulation (gauche) et de la croissance végétative (droite). En présence d'azote, les cellules se multiplient via des rondes successives de cycle mitotique. En absence d'azote, deux cellules haploïdes de sexe opposé (h^+ et h^-) fusionnent afin de former un zygote diploïde. Suite à la phase S pré-méiotique, ce zygote subit deux divisions nucléaires successives et une étape de maturation qui permet la production de spores. Ces spores possèdent la capacité de germer, c'est-à-dire de retrouver l'état prolifératif lorsque l'azote redevient disponible. Lorsque le zygote est transféré d'un milieu sans azote à un milieu riche avant le début de la phase S pré-méiotique, celui-ci pourra se multiplier temporairement via le cycle mitotique. Lorsque ces cellules diploïdes refont face à une carence d'azote, celles-ci ré-entreront rapidement dans le cycle méiotique de manière « azygotique ».

2.3. Principes de régulation des cycles cellulaires mitotique et méiotique

Afin que la sporulation ne soit déclenchée qu'au moment opportun, c'est-à-dire qu'en absence d'azote, plusieurs mécanismes cellulaires régulent l'initiation de ce processus de différenciation (Harigaya et Yamamoto, 2007, Otsubo et Yamamoto, 2012,

Yamamoto, 2010). Entre autre, plusieurs voies de signalisation, sensibles aux conditions environnementales, contrôlent l'activité de protéines clés dont le rôle est de soit promouvoir, ou inhiber l'enclenchement du processus de différenciation sexuelle. Ces protéines régulatrices sont essentielles afin que les deux modes de reproduction demeurent mutuellement exclusifs et que chacun soit mené à terme dans sa totalité. Plusieurs études ont d'ailleurs démontré que ces régulateurs sont critiques à la survie de *S. pombe*. Des mutations qui affectent leur activité mènent à divers phénotypes tels qu'à l'arrêt de la croissance cellulaire, à la diminution de la viabilité des ascospores ou à la mort cellulaire (Harigaya et Yamamoto, 2007, Yamamoto, 2010, Yamanaka *et al.*, 2010).

Étant donné que chaque mode de reproduction est intimement lié à son propre type de division cellulaire, les cycles mitotique et méiotique sont aussi mutuellement exclusifs (Harigaya et Yamamoto, 2007, Otsubo et Yamamoto, 2012, Yamamoto, 2010). Bien que ces deux cycles présentent certaines similarités mécanistiques, plusieurs événements sont spécifiques au cycle méiotique et à la sporulation (Mata *et al.*, 2002, Mata *et al.*, 2007). La formation du zygote diploïde, la recombinaison homologue suivie de deux divisions nucléaires plutôt qu'une et la formation d'une paroi cellulaire alternative beaucoup plus résistante en sont des exemples. Par conséquent, même si certaines protéines sont importantes lors des deux modes de reproduction, une multitude d'autres sont spécifiques au cycle méiotique et à la sporulation de sorte que celles-ci sont inutiles et dans certains cas, voire même néfastes lors de la croissance végétative (Egel, 2004, Mata *et al.*, 2002, Yamamoto, 2010).

Que ce soit lors du cycle mitotique ou méiotique, il est primordial que différents événements cellulaires s'enchaînent de manière séquentielle et ordonnée (Bahler, 2005, Cross *et al.*, 2011, McNerny, 2004). Par exemple, la duplication du génome doit nécessairement être complétée en entier avant que les copies puissent être également réparties (Cooke et Saunders, 2002). De plus, une fois que le matériel génétique est correctement distribué, les protéines impliquées dans ce processus doivent être désactivées de sorte à empêcher des aberrations qui découleraient de divisions nucléaires excédentaires (Aoi *et al.*, 2013). Des défauts dans l'exécution de ce type de séquence d'événements

entraînent généralement des conséquences néfastes sur la viabilité d'un organisme (Cooke et Saunders, 2002). Par conséquent, les protéines qui interviennent dans les différentes phases de chaque cycle cellulaire sont régulées de façon à ce qu'elles soient actives seulement au moment où elles sont requises. Ce principe est essentiel afin qu'il en découle une progéniture viable et ce, autant lors de la croissance végétative que lors de la sporulation (Yamamoto, 2010).

Différents niveaux de régulation contribuent à ce qu'une protéine soit présente et active exclusivement au moment où son action est requise dans la cellule. Un des premiers niveaux de régulation provient de la transcription. Chez la levure à fission, l'expression génique de plus de la moitié du génome varie entre le début et la fin du programme de différenciation qui mène à la production d'ascospores (Mata *et al.*, 2002). L'étude du transcriptome de *S. pombe* lors du cycle méiotique et de la sporulation a permis de constater que des batteries de gènes sont périodiquement exprimées (Mata *et al.*, 2002, Mata *et al.*, 2007). Plusieurs de ces transcrits sont d'ailleurs peu abondants voire même totalement absents lors de la croissance végétative (Chen *et al.*, 2012, Mata *et al.*, 2002).

Lors de tout le processus qui mène à la production d'ascospores, quatre vagues d'expression génique qui coïncident avec les étapes majeures du cycle méiotique et de la sporulation s'enchaînent de manière très ordonnée (Mata *et al.*, 2002). Des facteurs de transcription clés sont responsables d'activer l'expression des gènes de la vague en cours et de réprimer celle de la vague précédente (Mata et Bahler, 2006, Mata *et al.*, 2002, Mata *et al.*, 2007). L'activité de ces facteurs de transcription est régulée par plusieurs mécanismes de rétroaction positive et négative qui interviennent à différents niveaux (e.g. transcriptionnel, post-transcriptionnel et post-traductionnel) (Amorim *et al.*, 2010, Mata et Bahler, 2006, Mata *et al.*, 2007, Murakami-Tonami *et al.*, 2007, Pesin et Orr-Weaver, 2008). Ces mécanismes de contrôle de l'expression génique sont essentiels au bon déroulement du cycle méiotique et à la production d'ascospores matures et viables.

Les prochaines sections décriront brièvement les étapes associées à la croissance végétative et à la sporulation, de même que les mécanismes moléculaires, en particulier ceux de nature transcriptionnelle, qui régulent la sporulation chez la levure *S. pombe*.

2.4. La croissance végétative

2.4.1. Phases du cycle mitotique

En abondance d'azote, *S. pombe* croît et prolifère via le cycle cellulaire mitotique. Comme chez tous les eucaryotes, le cycle mitotique de la levure à fission, qui débute en phase G₁, est subdivisé en quatre phases qui se succèdent toujours dans l'ordre suivant, soit G₁, S, G₂ et M. Les phases G (*gap*) sont des phases d'intervalle pendant lesquelles la cellule se prépare aux phases S (*synthetic*) et M (*mitotic*) qui elles, sont respectivement dédiées à la réplication de l'ADN et la répartition de chaque copie dans chacune des deux cellules résultantes (Knutsen *et al.*, 2011, Lodish et Darnell, 2000, Nasmyth *et al.*, 1979, Nasmyth, 1979).

Chez *S. pombe*, le cycle mitotique présente certaines particularités. Premièrement, les phases G₁, S et M sont relativement courtes. Chacune d'entre elle représente environ 10% du temps total de la durée d'un cycle complet. La cellule occupe la majeure partie de son temps, soit les 70% restant, en phase G₂ (Hayles et Nurse, 1992, Knutsen *et al.*, 2011). De plus, la cytokinèse, qui scinde le cytoplasme en deux afin de séparer la cellule mère de la cellule fille, ne survient pas immédiatement après la mitose (comme chez les vertébrés) mais plutôt vers la fin de la phase S du cycle suivant (Knutsen *et al.*, 2011, Sabatinos et Forsburg, 2010). Par conséquent, les phases G₁ et S sont pratiquement indissociables à l'œil nu puisque le septum de division, qui a l'apparence d'une cloison, reste présent de la fin de la phase M à la fin de la phase S du cycle suivant.

Le cycle mitotique débute donc en phase G₁ et coïncide avec la production de protéines qui permettent à la cellule de croître (Mitchison et Nurse, 1985). Une fois qu'elle a atteint une taille critique, la cellule poursuit son cycle en phase S et réplique l'ADN de

son génome en entier (Lodish et Darnell, 2000, Martin-Castellanos *et al.*, 2000, Nasmyth *et al.*, 1979, Norbury et Nurse, 1992). Durant cette phase, *S. pombe* passe de 1C à 2C (où C représente une copie chromatinienne). Une fois que la réplication de l'ADN est complétée, la cellule entre en phase G₂. Pendant ce deuxième intervalle, la cellule continue de croître en se préparant à la phase subséquente (Mitchison et Nurse, 1985). Une fois que la cellule a atteint une taille critique, celle-ci peut entrer en phase M (Lodish et Darnell, 2000, Nasmyth *et al.*, 1979, Norbury et Nurse, 1992). Durant cette phase, la cellule envoie chaque copie de son génome vers chaque pôle cellulaire opposé. Ultimement (lors de la phase S du cycle suivant), la cytokinèse permettra la formation de deux cellules haploïdes génétiquement identiques et indépendantes (Knutsen *et al.*, 2011, Lodish et Darnell, 2000, Sabatinos et Forsburg, 2010).

Du point de vue de la dynamique chromatinienne, les phases G₁, S et G₂ correspondent à l'interphase tandis que la phase M, souvent appelée mitose, est subdivisée en quatre étapes : la prophase, la métaphase, l'anaphase et la télophase (Lodish et Darnell, 2000).

2.4.2. Étapes de la mitose

Lors de la prophase mitotique, la chromatine nucléaire se condense en chromosomes (Lodish et Darnell, 2000). Les paires de chromosomes identiques s'associent au niveau de leur structure centrale, le centromère, afin de former des paires de chromatides-sœurs. Parallèlement, le fuseau de division débute sa formation. Le centrosome (appelé *spindle pole body* chez la levure) se dédouble et chacun d'entre eux migre de part et d'autre du noyau. À partir de chaque centrosome, les microtubules ou microfilaments (i.e. des polymères composés de dimères de tubuline α et β) débutent leur polymérisation et formeront les fibres du fuseau de division. Les paires de chromatides-sœurs se fixent aux extrémités des microtubules via leurs kinétochores, des complexes protéiques situés de part et d'autre de chaque centromère (Egel, 2004, Lodish et Darnell, 2000).

Ensuite, lors de la métaphase, les paires de chromatides-sœurs migrent vers le centre du noyau grâce aux microtubules auxquelles elles sont fixées et aux protéines motrices qui leur sont associées (Lodish et Darnell, 2000). Une fois que toutes les paires de chromatides-sœurs sont parfaitement alignées sur la dite « plaque équatoriale », c'est-à-dire au centre du noyau, l'anaphase se déclenche. Les microtubules exercent une tension sur chaque kinétochore, ce qui engendre la séparation des chromatides-sœurs. Les microtubules débutent leur dépolymérisation et les protéines motrices permettent à chaque chromatide-sœur (maintenant séparés) de migrer en direction opposée (Egel, 2004, Lodish et Darnell, 2000).

Finalement, lors de la télophase, les microtubules sont complètement dépolymérisés et l'anneau contractile, qui correspond au septum de division, se forme (Lodish et Darnell, 2000). Chaque jeu haploïde de chromatides se fixe de part et d'autre du septum et ceux-ci commencent à se décondenser en chromatine. La cellule-mère et la cellule-fille restent liées par leur septum de division puisque celui-ci ne se scinde que lors de la phase S du cycle suivant. Si les conditions environnementales sont favorables à la croissance végétative, la cellule-mère et la cellule-fille peuvent donc maintenant entrer en phase G₁ et débiter une nouvelle ronde du cycle mitotique (Egel, 2004, Lodish et Darnell, 2000).

2.4.3. Régulation du cycle mitotique et points de contrôle

Chez les eucaryotes, la progression du cycle mitotique est contrôlée par des protéines conservées, les cyclines et les kinases cycline-dépendantes (Cdk) (Lodish et Darnell, 2000). Les Cdk sont des Ser/Thr protéines kinases qui activent ou inhibent la fonction de cibles impliquées dans différents aspects du cycle cellulaire. Les cyclines, quant à elles, sont des protéines régulatrices qui s'associent aux Cdk afin de les activer et de moduler leur spécificité. Les associations cycline-Cdk intègrent une multitude de signaux provenant autant de l'intérieur que de l'extérieur de la cellule (Cross *et al.*, 2011, Lodish et Darnell, 2000, Stern et Nurse, 1996).

Différents points de contrôle sont aussi essentiels au bon déroulement du cycle mitotique. Les protéines associées à ces points de contrôle régulent la progression du cycle en empêchant, entre autre, l'association des Cdk avec leurs cyclines régulatrices. Lorsque les conditions requises pour passer d'une phase à la suivante ne sont pas rencontrées, des inhibiteurs de Cdk sont activés et ralentissent ou provoquent l'arrêt du cycle en régulant négativement les associations cycline-Cdk (Cross *et al.*, 2011, Gillett *et al.*, 2004, Lodish et Darnell, 2000, Longhese *et al.*, 1998).

Chez *S. pombe*, la progression du cycle mitotique est principalement contrôlée par la kinase cycline-dépendante Cdk1 (aussi appelée Cdc2) (Beach *et al.*, 1982, Lee et Nurse, 1987, Simanis et Nurse, 1986). L'activité de Cdk1 est principalement modulée par trois cyclines de type B, soit Cig1, Cig2 et Cdc13 (Fisher et Nurse, 1995, Stern et Nurse, 1996). Ce sont les associations entre Cdk1 et ces différentes cyclines B qui régulent la progression du cycle mitotique. De plus, le cycle mitotique comprend plusieurs points de contrôles, dont trois principaux qui régulent les transitions entre les phases G₁/S (appelé *start* chez la levure, ou point de restriction chez les vertébrés), G₂/M et M/G₁ (Hayles et Nurse, 1992, Lodish et Darnell, 2000, Norbury et Nurse, 1992, Nurse et Bissett, 1981).

Une cellule qui débute une nouvelle ronde du cycle mitotique rencontre un premier point de contrôle vers la fin de la phase G₁ (point de contrôle G₁/S ou *start*) (Nurse et Bissett, 1981). Chez *S. pombe*, ce point de contrôle permet à la cellule de s'assurer que certains nutriments essentiels, tel que l'azote, sont présents en quantités suffisantes afin de pouvoir s'engager de manière irréversible dans le cycle mitotique (Egel, 2004, Fantes, 1989). Si ces exigences sont rencontrées, la cycline Cig2 s'associe à Cdk1, ce qui entraîne l'activation de la kinase : la cellule devient alors engagée dans le cycle mitotique et la phase S débute (Bueno et Russell, 1993, Martin-Castellanos *et al.*, 2000, Mondesert *et al.*, 1996). Si les exigences nutritionnelles ne sont pas rencontrées (e.g. en absence d'azote), la protéine inhibitrice p25^{rum1} se lie à Cdk1 et empêche l'association de la kinase à sa cycline activatrice, ce qui entraîne le blocage du cycle en phase G₁ (Benito *et al.*, 1998, Martin-Castellanos *et al.*, 1996). Par conséquent, peu importe la phase dans laquelle une cellule se trouve, en réponse à un manque d'azote, celle-ci bloquera éventuellement en phase G₁.

C'est spécifiquement lors de ce blocage qu'il se crée une fenêtre d'opportunité pendant laquelle *S. pombe* peut quitter l'état prolifératif pour initier son processus de différenciation sexuelle permettant la production d'ascospores (Egel, 2004).

En absence de partenaire sexuel compatible, une cellule qui stagne en phase G_1 en absence d'azote deviendra éventuellement quiescente, c'est-à-dire qu'elle entrera en phase stationnaire G_0 (si les conditions nutritives demeurent inchangées). En présence d'un partenaire sexuel compatible, la cellule enclenchera le processus de différenciation qui pourra provoquer sa fusion avec une cellule de type sexuel opposé de sorte à former un zygote diploïde. Suite à ce processus appelé « caryogamie », une cascade d'activation fera entrer de manière irréversible le zygote diploïde dans le cycle cellulaire méiotique afin d'assurer la production d'ascospores (Egel, 2004).

2.5. La sporulation

S. pombe prolifère normalement à l'état haploïde et est de type sexuel P (h^+) ou M (h^-). En présence d'azote, les cellules prolifèrent via le cycle mitotique et ce, peu importe leur type sexuel. En absence d'azote, les cellules bloquent en G_1 et celles de sexe opposé peuvent fusionner pour donner naissance à des zygotes diploïdes (h^+/h^-) qui s'engageront de manière irréversible dans le cycle cellulaire méiotique (Egel, 1973, Egel, 2004, Egel et Egel-Mitani, 1974, Otsubo et Yamamoto, 2012).

Chez *S. pombe*, plusieurs mécanismes contrôlent le déclenchement du processus de différenciation sexuelle. La transition entre un mode de croissance végétatif et la sporulation repose entre sur l'activité de la protéine Ste11, un facteur de transcription de type HMGB (*high mobility group B*) (Sugimoto *et al.*, 1991). Ste11 active l'expression de la grande majorité des gènes requis pour le déclenchement du processus de différenciation sexuelle chez *S. pombe* (Mata et Bahler, 2006). Ces gènes incluent ceux retrouvés au locus *mat*, dont les produits protéiques stimulent la fusion entre deux cellules de sexe opposé, ainsi que *mei2*⁺, un gène qui code pour une protéine cruciale dans l'initiation du cycle cellulaire méiotique (Egel, 1973, Shimoda *et al.*, 1985, Watanabe *et al.*, 1988).

La protéine Mei2 possède un domaine de liaison à l'ARN qui reconnaît l'ARN non-codant appelé meiRNA (transcrit via le locus *sme2⁺*) (Harigaya *et al.*, 2006, Watanabe et Yamamoto, 1994). Suite à la fusion entre deux cellules de sexe opposé, Mei2 se lie à son ARN cible et le complexe Mei2-meRNA séquestre Mmi1 (Shichino *et al.*, 2014). La protéine Mmi1 possède un domaine de liaison à l'ARN qui reconnaît un motif de six ribonucléotides connu sous le nom de DSR (*determinant of selective removal*) (Harigaya *et al.*, 2006, Yamashita *et al.*, 2012). Lors de la croissance végétative, Mmi1 lie plusieurs transcrits qui codent pour des protéines essentielles à l'initiation du cycle méiotique et stimule leur dégradation via l'exosome nucléaire (Harigaya *et al.*, 2006, St-Andre *et al.*, 2010). Suite à l'inactivation de Mmi1 par le complexe Mei2-meRNA, les transcrits qui étaient négativement régulés sont stabilisés et les protéines qui en découlent peuvent participer à l'initiation du cycle méiotique (Harigaya *et al.*, 2006).

Finalement, afin que le cycle méiotique soit totalement enclenché et ce, de manière irréversible, la kinase Pat1 (aussi appelée Ran1) doit être inactivée (Beach *et al.*, 1985, Iino et Yamamoto, 1985). Lors de la croissance végétative, cette Ser/Thr protéine kinase bloque les fonctions de Ste11 et de Mei2 en les phosphorylant sur certains résidus spécifiques (Kitamura *et al.*, 2001). Suite à la fusion entre deux cellules de sexe opposé, une cascade d'activation permet la production d'un inhibiteur de l'activité kinase de Pat1, ce qui résulte en la pleine activation de Ste11 et de Mei2 (Li et McLeod, 1996). Suite à cet événement, les cellules sont engagées de manière définitive dans le cycle méiotique (Yamamoto, 1996).

2.5.1. Le statut nutritionnel et la régulation de Ste11

L'expression du gène *ste11⁺* est sous le contrôle de plusieurs voies de signalisation qui répondent à différents facteurs tels que le statut nutritionnel, la présence de phéromones sexuelles et le stress cellulaire (Anandhakumar *et al.*, 2013, Otsubo et Yamamoto, 2012). Ces voies de signalisation sont conservées chez une multitude d'organismes, de la levure à l'homme, et incluent celles de l'adénosine monophosphate cyclique (AMPC), *target of rapamycin* (TOR) *complex I* (TORC1) de même que deux voies des *mitogen-activated*

protein kinase (MAPK) (Otsubo et Yamamoto, 2012, Yamamoto, 2010). L'activité de la protéine Ste11 est également contrôlée par plusieurs autres protéines régulatrices. Ces régulateurs et ces voies de signalisation, ainsi que les boucles de rétroaction positives ou négatives qu'elles stimulent, convergent toutes vers l'expression et l'activité de Ste11 afin de réguler le déclenchement du processus de différenciation sexuelle chez *S. pombe* (Anandhakumar *et al.*, 2013, Otsubo et Yamamoto, 2012).

2.5.1.1. Régulation négative par la présence d'azote

En présence d'azote, le gène *ste11*⁺ est peu transcrit et l'activité du peu de Ste11 qui en découle est inactivée par différentes Ser/Thr protéines kinases (Anandhakumar *et al.*, 2013, Otsubo et Yamamoto, 2012). Premièrement, dans une cellule végétative, Cdk1 phosphoryle Ste11 au niveau de sa Thr82, ce qui inhibe son activité de liaison à l'ADN (Kjaerulff *et al.*, 2007). Lorsque Cdk1 est active, Ste11 ne peut donc pas s'associer aux promoteurs de ses gènes cibles afin d'en activer l'expression (Benito *et al.*, 1998). Par conséquent, Ste11 peut exclusivement activer l'expression de ses gènes cibles lorsque l'activité de Cdk1 est faible, c'est-à-dire en absence d'azote (lors de l'inactivation de Cdk1 par p25^{um1}) à partir de la phase G₁ seulement (Benito *et al.*, 1998, Kjaerulff *et al.*, 2007).

En présence d'azote, Ste11 est aussi phosphorylée au niveau de ses résidus Thr173 et Ser218 par la kinase Pat1 (Kitamura *et al.*, 2001). Cette phosphorylation stimule l'association de Ste11 avec la protéine de la famille 14-3-3, Rad24, qui séquestre le facteur de transcription au cytoplasme. De plus, par un mécanisme à ce jour peu caractérisé, la forme phosphorylée de Ste11 est constitutivement ubiquitinylée et dégradée via le protéasome (Kitamura *et al.*, 2001). La pleine activation de Ste11 requiert donc nécessairement l'inactivation de Pat1.

Le complexe TORC1 (qui comprend une sous-unité catalytique, Tor2) et la protéine kinase A (PKA) participent aussi à la régulation négative de Ste11. En présence d'azote, Tor2 et PKA phosphorylent Ste11, ce qui contribue à l'inactivation de Ste11 en

l'empêchant d'entrer au noyau et en stimulant sa dégradation via le protéasome (Valbuena et Moreno, 2010).

Étant donné que Ste11 lui-même contribue à activer sa transcription en liant son propre promoteur, l'ensemble de tous ces mécanismes d'inactivation contribue également à réprimer l'expression de *ste11*⁺ et donc, à promouvoir la croissance végétative lorsque l'azote est présent en quantité suffisante (Higuchi *et al.*, 2002, Sugimoto *et al.*, 1991).

2.5.1.2. Régulation positive par l'absence d'azote

Lorsque les sources assimilables d'azote deviennent insuffisantes afin de permettre la croissance végétative, l'expression du gène *ste11*⁺ augmente progressivement grâce à différents mécanismes qui se mettent en branle de manière synergique (Anandhakumar *et al.*, 2013, Otsubo et Yamamoto, 2012). En réponse à l'absence d'azote, le niveau intracellulaire d'AMPC, un second messenger synthétisé à partir de l'ATP, diminue progressivement (Mochizuki et Yamamoto, 1992). La réduction du niveau d'AMPC entraîne l'inactivation de la PKA, qui n'est plus en mesure de phosphoryler et de réguler négativement ni Ste11, ni l'activité de liaison à l'ADN de Rst2, un facteur de transcription qui possède des motifs à « doigts de zinc » de type C₂H₂ (Higuchi *et al.*, 2002, Hoffman et Winston, 1991, Kunitomo *et al.*, 2000, Maeda *et al.*, 1990). Suite à l'inactivation de la PKA, Rst2 s'associe au promoteur de *ste11*⁺ et induit son expression (Higuchi *et al.*, 2002).

Une deuxième voie de signalisation, celle des MAPK de réponse au stress, contribue également à l'induction du gène *ste11*⁺ (Otsubo et Yamamoto, 2012). Chez *S. pombe*, cette voie de signalisation répond à différents stimuli tels que le choc de température, le choc osmotique et le stress oxydatif (Degols *et al.*, 1996, Millar *et al.*, 1995, Shiozaki et Russell, 1995). Lorsque cette voie est activée, une cascade de phosphorylation qui est initiée par la MAPKKK Win1/Wis4 provoque l'activation de la MAPK effectrice Sty1 (Millar *et al.*, 1995, Samejima *et al.*, 1997, Samejima *et al.*, 1998, Shiozaki et Russell, 1995). En réponse à ces différents stress cellulaires, Sty1 peut phosphoryler une multitude de cibles, dont le facteur de transcription Atf1. La forme phosphorylée d'Atf1

hétérodimérise avec Pcr1 et active l'expression de plusieurs gènes qui permettent à la cellule de « résister » à ces différents stress environnementaux (Kano *et al.*, 1996, Reiter *et al.*, 2008).

En réponse à l'absence d'azote, le régulateur de réponse Mcs4 stimule l'activation de la MAPKKK Wis4/Win1 (Sukegawa *et al.*, 2011). La MAPK Sty1 devient alors active et stimule l'expression de *ste11*⁺ selon deux mécanismes. Le premier mécanisme, encore mal compris, implique l'hétérodimère Atf1/Pcr1 et serait de nature transcriptionnelle (Kano *et al.*, 1996, Shiozaki et Russell, 1995, Watanabe et Yamamoto, 1996). Le second mécanisme, qui est beaucoup mieux caractérisé, vise l'activation de l'ARN polymérase II spécifiquement au promoteur de *ste11*⁺ via la phosphorylation de le Ser2 du domaine C-terminal (CTD) par Sty1 (Coudreuse *et al.*, 2010, Sukegawa *et al.*, 2011). Ces deux mécanismes contribuent eux aussi à l'activation transcriptionnelle du gène *ste11*⁺.

L'activité de la protéine Ste11 est également modulée en réponse à l'absence d'azote. Suite au manque de ce nutriment, p25^{rum1} s'accumule (exclusivement lors de la phase G₁) et inhibe la kinase Cdk1 en l'empêchant de s'associer à sa cycline activatrice Cig2 (Benito *et al.*, 1998, Kjaerulff *et al.*, 2007). Par conséquent, les cellules bloquent en phase G₁ et Ste11 devient en mesure de lier l'ADN. L'activité de la kinase Tor2 du complexe TORC1 est également sensible au statut nutritionnel. Le mécanisme demeure incompris mais en réponse à l'absence d'azote, Tor2 devient inactive et n'est plus en mesure de promouvoir l'exclusion nucléaire et l'instabilité protéique de Ste11 (Valbuena et Moreno, 2010).

Suite à tous ces événements de régulation positive, un pool actif de Ste11 est généré, spécifiquement lors de la phase G₁ (Kjaerulff *et al.*, 2007). Ce pool représente le premier niveau d'activation du facteur de transcription. Il en découle une fenêtre d'opportunité pendant laquelle Ste11 devient en mesure d'activer l'expression des gènes retrouvés au locus *mat* qui eux, sont requis afin de permettre la fusion entre deux cellules de type sexuel opposé (Mata et Bahler, 2006, Sugimoto *et al.*, 1991).

2.5.2. Croisement entre deux cellules de type sexuel opposé

Chez *S. pombe*, le sexe d'une cellule est déterminé par la nature de la séquence qu'elle contient à son locus *mat* (situé le chromosome II) (Egel, 1973, Kelly *et al.*, 1988). Si le locus contient la séquence P (*matI-P*), la cellule est dite h^+ tandis que si ce locus contient la séquence M (*matI-M*), la cellule est dite h^- . Chaque locus *matI* (*P* ou *M*) contient deux unités transcriptionnelles. Dans le cas de la cellule h^+ , ces deux unités sont constituées des gènes *matI-Pc* et *matI-Pm* tandis que dans le cas d'une cellule h^- , les deux unités sont constituées des gènes *matI-Mc* et *matI-Mm*. Les gènes *matI-Pc* et *matI-Mc* codent pour des facteurs de transcription qui sont essentiels à l'induction de gènes spécifiques à chaque type sexuel. Ces gènes codent pour des protéines qui permettent la reconnaissance du sexe d'une cellule voisine et subséquemment, la fusion entre deux cellules de sexes opposés (Egel, 2004, Otsubo et Yamamoto, 2012).

La génération d'un pool actif de Ste11 permet la transactivation des gènes *matI-Pc* (dans une cellule h^+) et *matI-Pm* (dans une cellule h^-) (Mata et Bahler, 2006). Les facteurs de transcription codés par ces deux gènes activent à leur tour l'expression des gènes spécifiques à chaque type sexuel. Pour une cellule h^+ , ces gènes incluent *map2*⁺, qui code pour la phéromone P (un peptide de 23 résidus) ainsi que *map3*⁺, qui code pour le récepteur à la phéromone M. Pour une cellule h^- , ces gènes incluent *mfm1*⁺, *mfm2*⁺ et *mfm3*⁺, qui codent tous pour la phéromone M (un peptide de 9 résidus) ainsi que *mam2*⁺, qui code pour le récepteur à la phéromone P. Les peptides correspondant aux deux types de phéromones (P et M) seront sécrétés par les cellules tandis que les récepteurs pourront être synthétisés, maturés et amenés à la surface cellulaire (Egel, 2004, Otsubo et Yamamoto, 2012).

La phéromone P se lie exclusivement au récepteur exprimé à la surface de la cellule M (Mam2) tandis que la phéromone M se lie exclusivement au récepteur exprimé à la surface de la cellule P (Map3). Mam2 et Map3 sont des récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés à la même protéine G. Suite à la liaison de la phéromone P et M à son récepteur respectif, celle-ci est internalisée, ce qui entraîne l'activation de la sous-unité alpha Gpa1 qui stimule la voie de signalisation des MAPK Byr2(MAPKKK) /

Byr1(MAPKK) / Spk1(MAPK). Ce signal de transduction permet à Spk1 (aussi appelée Spc1) de phosphoryler différentes cibles qui, entre autre, renforcent l'expression de *ste11*⁺ et stimulent un mouvement de chimiotaxie d'une cellule P vers une cellule M et vice versa (Merlini *et al.*, 2013, Otsubo et Yamamoto, 2012).

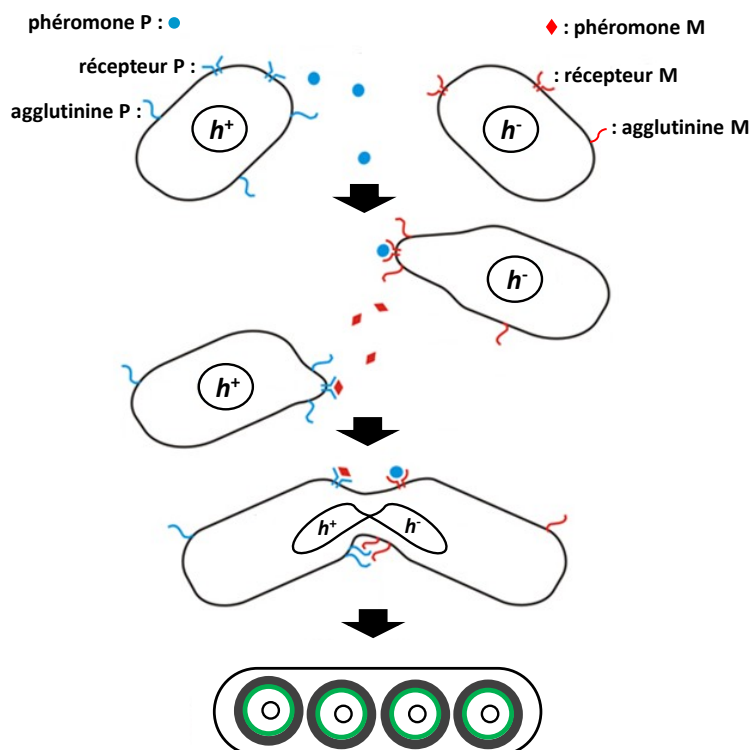


Figure 2. Fusion entre deux cellules de sexe opposé chez *S. pombe*. En absence d'azote, la cellule h^+ exprime les protéines spécifiques au type sexuel P, soit la phéromone P (Mam2), le récepteur P (Mam3) et l'agglutinine P (Map4) tandis que la cellule h^- exprime celles de type M, soit la phéromone M (Mam2), le récepteur M (Mfm1-3) et l'agglutinine M (Mam3). Suite au contact physique entre deux cellules de sexes opposés, celles-ci entreprennent le processus de caryogamie afin de former un zygote diploïde qui, grâce au cycle méiotique, produira quatre ascospores matures, qui sont ici représentées par des sphères de couleur verte (membrane des ascospores) et grise (paroi des ascospores).

2.5.2.1. Activation de Ste11 par les phéromones sexuelles

Suite à l'activation des récepteurs aux phéromones, Spk1 phosphoryle Ste11 au niveau de ses Thr 305 et 317, ce qui stimule la capacité de Ste11 de s'auto-activer via la

liaison de son propre promoteur. Cette phosphorylation entraîne également l'induction de *ste6*⁺, une autre cible transcriptionnelle de Ste11. Via un mécanisme de rétroaction positive impliquant la protéine Ras, Ste6 renforce le signal de transduction des phéromones sexuelles en stimulant l'activité de la MAPKKK Byr2 (Aono *et al.*, 1994, Hughes *et al.*, 1994, Kjaerulff *et al.*, 2005, Xue-Franzen *et al.*, 2006).

2.5.2.2. Formation du zygote diploïde

Suite à la liaison des phéromones P et M à leur récepteur respectif, le niveau d'activité atteint par Ste11 permet aux cellules de sécréter des quantités de plus en plus importantes de phéromones sexuelles (via la transactivation des gènes au locus *mat*) (Anandhakumar *et al.*, 2013, Harigaya et Yamamoto, 2007). Ce phénomène résulte en la génération de micro-gradients de phéromones P et M dans l'environnement des cellules *h*⁺ et *h*⁻. Ces micro-gradients constituent un moyen de chimiotaxie pour les cellules en différenciation : seulement celles de types sexuels opposés deviennent attirées l'une vers l'autre. En effet, lorsqu'une phéromone se lie à son récepteur correspondant, la cellule initie la formation d'une petite excroissance à l'endroit où la phéromone a été internalisée. Des protéines appartenant à différentes classes, dont les GTPases Cdc42 et Ras, stimulent la polymérisation de filaments d'actine qui permettent l'expansion de cette excroissance (Merlini *et al.*, 2013).

Une fois que le contact entre deux cellules de sexes opposés (*h*⁺ et *h*⁻) survient, celles-ci s'accrochent une à l'autre via des protéines de surface glycosylées, les agglutinines P et M. Ensuite, des enzymes spécialisées sont recrutées au niveau des excroissances afin d'en digérer localement la paroi cellulaire. Les membranes lipidiques exposées fusionnent et les cytoplasmes de la cellule *h*⁺ et *h*⁻ entrent en contact. Le matériel génétique provenant de chaque cellule s'associe afin de former un génome diploïde (Merlini *et al.*, 2013). Cette étape de fusion, appelée la caryogamie, est l'équivalent du processus d'union entre le génome du spermatozoïde et celui de l'ovule lors de la fécondation chez les mammifères (Handel et Schimenti, 2010). Chez *S. pombe*, suite à cette étape, une cascade d'activation provoque l'initiation du cycle méiotique et les zygotes

diploïdes s'engagent de manière irréversible dans la production d'ascospores (Harigaya et Yamamoto, 2007).

2.5.2.3. Méiose zygotique vs azygotique

Suite à la caryogamie, une cascade d'activation se déclenche et force le zygote diploïde à s'engager rapidement dans le cycle méiotique. Ce type de méiose (enclenchée directement à partir du zygote) est qualifiée de « zygotique ». Dans la nature, les ascospores produites par *S. pombe* découlent normalement de ce type de méiose (Egel, 2004, Loidl et Lorenz, 2009).

En laboratoire, il est possible d'isoler un zygote diploïde juste avant que la cascade d'activation qui initie le cycle méiotique ait lieu. Si ce zygote est transféré de son milieu nutritif minimal (sans azote) à un milieu riche (avec azote), un retour à la croissance végétative (à l'état diploïde) sera favorisé au détriment de la sporulation. En effet, ce zygote diploïde retrouvera la physiologie d'une cellule végétative, en apparence plus large et plus longue, et prolifèrera via le cycle mitotique. Si cette cellule diploïde est ensuite replacée dans un milieu où l'azote est manquant, la cascade d'activation pourra quand même être déclenchée et le cycle méiotique sera initié. Ce type de méiose est qualifiée d'« azygotique » puisqu'elle n'est pas directement induite à partir d'un zygote mais plutôt à partir d'une cellule végétative diploïde. Étant donné que physiologiquement, ces deux types d'induction méiotique sont aussi valables l'une que l'autre, la méiose azygotique est souvent favorisée en laboratoire puisque celle-ci permet de mieux contrôler à quel moment le cycle méiotique peut être déclenché dans une population de cellules. Ce meilleur contrôle favorise l'obtention de populations plus homogènes lors de leur progression dans le cycle méiotique (Loidl et Lorenz, 2009, Sabatinos et Forsburg, 2010).

Étant donné que *S. pombe* est normalement de nature haploïde, la croissance végétative à l'état diploïde est un mode de reproduction qui s'avère peu viable à long terme. En effet, une population de cellules végétatives diploïdes retrouvera son état haploïde après un maximum de trois à quatre semaines (sur gélose nutritive riche maintenue à 4°C). Le

mécanisme qui permet ce changement de ploïdie reste à ce jour très obscur (Loidl et Lorenz, 2009).

2.5.3. Cascade d'initiation du cycle méiotique

Suite à la formation du zygote diploïde, les facteurs de transcription codés par les gènes *mat1-Pm* (spécifique à la cellule h^+) et *mat1-Mc* (spécifique à la cellule h^-) co-activent l'expression du gène *mei3⁺* (McLeod *et al.*, 1987). La transcription de *mei3⁺* est par conséquent exclusive au zygote h^+/h^- . Plusieurs données indiquent que Mei3 se complexe à Pat1, ce qui a pour effet de paralyser son activité kinase en lui servant de pseudo substrat (Li et McLeod, 1996, McLeod et Beach, 1988). L'inhibition de Pat1 par Mei3 résulte en la pleine activation de Ste11 qui désormais ne subit plus aucun mécanisme de régulation négative (Kjaerulff *et al.*, 2005, Li et McLeod, 1996). Ste11 devient en mesure d'activer pleinement l'expression de tous ses gènes cibles, dont *mei2⁺* (Kjaerulff *et al.*, 2005, Mata et Bahler, 2006). L'accumulation de complexes meiRNA-Mei2 provoque l'inactivation de Mmi1, ce qui favorise la stabilisation de plusieurs transcrits qui codent pour des protéines essentielles à l'initiation du cycle méiotique (Harigaya *et al.*, 2006, Yamamoto, 2010). Ce dernier événement marque l'enclenchement du cycle méiotique de manière irréversible et définitive (Harigaya *et al.*, 2006, Yamamoto, 2010).

2.5.4. Étapes du cycle méiotique et de la sporulation

Le cycle méiotique débute par une phase S dite « pré-méiotique », c'est-à-dire qui précède les divisions méiotiques, durant laquelle l'ADN du zygote ou de la cellule diploïde est répliqué (Lodish et Darnell, 2000). Chaque copie du génome, dont une provenant de la cellule h^+ et l'autre de la cellule h^- , est dupliquée si bien que la cellule passe de 2C à 4C. Une fois complétée, la phase S pré-méiotique est suivie d'une étape de recombinaison homologue et de deux divisions nucléaires successives lors des méioses I (MI) et II (MII). Lors de la MI, les paires de chromosomes homologues échangent une partie de leur matériel génétique avant d'être ségréguées, générant ainsi 2 X 2C. Par la suite, lors de la MII, les chromatides-sœurs de chaque paire sont séparées, ce qui résulte en la production de

quatre jeux haploïdes de chromosomes (4 X 1C). Similairement à la phase M du cycle mitotique, les méioses I et II sont subdivisées en prophases, métaphases, anaphases et télophases I et II (Lodish et Darnell, 2000).

Chez la plupart des organismes se reproduisant de manière sexuée (y compris *S. pombe*), la prophase I représente l'étape la plus longue et la plus complexe de tout le cycle méiotique (Lodish et Darnell, 2000). Au début de cette phase, la chromatine nucléaire se condense en chromosomes. Ceux provenant de la cellule h^+ s'associent avec leur propre copie (h^+/h^+) et ceux provenant de la cellule h^- font de même (h^-/h^-). Suite à la formation des paires de chromosomes homologues, les deux extrémités de chaque chromosome (i.e. les télomères) se lient au centrosome, qui est à ce moment encore unique dans le noyau. Tous les télomères se retrouvent alors regroupés en un point unique (Chikashige *et al.*, 1994, Chikashige *et al.*, 2006). Afin de permettre cet arrangement, les chromosomes se laissent se recourber sur eux-mêmes et adoptent une conformation dite en forme de « bouquet », une structure conservée chez de nombreux organismes de la levure à l'homme (Lodish et Darnell, 2000). Plusieurs données suggèrent que la formation du bouquet facilite l'établissement des synapses, c'est-à-dire des régions d'appariement entre les paires de chromosomes homologues, de sorte à ce que ces paires deviennent des tétrades de chromosomes (Scherthan, 2001). Suite à ces événements, le centrosome (à l'aide de protéines associées au cytosquelette) exerce une pression sur la membrane nucléaire de façon à ce que le noyau puisse s'allonger pour ensuite initier un mouvement oscillatoire d'un bout à l'autre cellule (Chikashige *et al.*, 2014, Robinow, 1977). Par conséquent, le bouquet de chromosomes (fixé au centrosome) suit ce mouvement qui apparaît sous forme d'une queue de cheval se promenant de manière aléatoire de part et d'autre de la cellule. Ce phénomène, particulièrement apparent chez la levure à fission, est appelé le mouvement *horsetail* (dû à sa forme visuelle) (Chikashige *et al.*, 2014, Robinow, 1977). Plusieurs données suggèrent que la phase *horsetail* favorise les synapses, mais aussi l'enjambement (ou *crossing-over*), soit le processus qui permet la recombinaison entre les paires de chromosomes homologues. En effet, c'est lors de la phase *horsetail* que les paires de chromosomes homologues s'entrechoquent entre elles, ce qui provoquerait efficacement la formation de cassures doubles brins et l'échange de matériel chromosomique entre les

paires de chromosomes h^+/h^+ et h^-/h^- (Cromie et Smith, 2008). C'est ce processus de brassage génétique, hautement conservé chez les eucaryotes, qui contribue à la diversité entre les individus et qui crée de nouvelles combinaisons de gènes pouvant conduire, à plus long terme, à l'évolution et à la survie d'une espèce (Lodish et Darnell, 2000).

Une fois la recombinaison homologue complétée, le mouvement *horsetail* s'arrête et le noyau se stabilise au centre de la cellule (Lodish et Darnell, 2000). Les tétrades de chromosomes se détachent du centrosome qui maintenant peut se dédoubler afin de permettre la formation d'un premier fuseau de division méiotique. Les tétrades de chromosomes se lient aux microtubules du fuseau (via les kinétochores présents de chaque côté des tétrades) et migrent vers le centre du noyau. Le cycle se poursuit alors en métaphase I. Les tétrades de chromosomes s'alignent parfaitement au centre du noyau (les kinétochores orientés en directions opposées). Ensuite, lors de l'anaphase I, les microtubules exercent une tension qui sépare les paires de chromosomes homologues. Chaque paire est ségrégée en directions opposées et le fuseau de division se rétracte lors de la télophase I afin que le cycle puisse se poursuivre en MII (Lodish et Darnell, 2000).

Chez *S. pombe*, la prophase ainsi que la métaphase II sont de très courte durée (e.g. d'une à quelques dizaines de minutes) de sorte que l'anaphase II survient très rapidement après la première division méiotique (Bahler *et al.*, 1991). Lors de la prophase II, les deux centrosomes se dédoublent, permettant ainsi la formation de deux fuseaux de division méiotique. Chaque paire de chromatides-sœurs se fixe à son fuseau respectif et celles-ci s'alignent rapidement lors de la métaphase II. Ensuite, les chromatides-sœurs de chaque paire sont séparées et migrent en directions opposées lors de l'anaphase II. Les quatre jeux haploïdes du génome sont enfin complètement dissociés les uns des autres. Lors de la télophase II, les chromosomes débutent leur décondensation et les fuseaux de division se dépolymérisent. Les divisions méiotiques sont alors complétées (Lodish et Darnell, 2000).

Chez *S. pombe*, la membrane lipidique des ascospores, qui sert d'échafaudage au dépôt de glycoprotéines composant leur paroi, débute sa formation pendant les divisions méiotiques (Tanaka et Hirata, 1982). Selon un mécanisme toujours incompris, les

constituants lipidiques provenant de différents compartiments (e.g. la membrane cellulaire, le réticulum endoplasmique, les vacuoles et les différentes vésicules des voies de sécrétion) sont recyclés et amenés à proximité du matériel chromosomique pendant les divisions nucléaires des MI et MII (Kashiwazaki *et al.*, 2011, Shimoda, 2004). De cette façon, suite à la MII, les quatre jeux haploïdes de chromosomes sont très rapidement entourés d'une membrane lipidique complète (Nakamura *et al.*, 2008). La maturation des spores peut alors débuter : leur paroi résistante se forme et leur métabolisme est réduit au minimum (Tanaka et Hirata, 1982). Ces événements représentent les dernières étapes de la sporulation. Une fois menés à terme, les ascospores formées sont viables et fonctionnelles, c'est-à-dire qu'elles sont en mesure de germer, à condition que 1- l'azote redevienne disponible et 2- que l'asque se brise et que les ascospores en soient expulsées (Egel, 2004).

Afin que l'asque puisse se former, la paroi de la cellule méiotique est également modifiée lors du cycle. Malgré que peu de données existent sur la composition de cet asque et que son processus de formation demeure peu étudié, on remarque que dès la première division méiotique, la paroi cellulaire débute sa transformation (Kashiwazaki *et al.*, 2011, Shimoda, 2004).

Chez *S. pombe*, l'asque représente une structure beaucoup moins résistante que la paroi de la cellule végétative (Loidl et Lorenz, 2009). En absence de stress, les ascospores peuvent y rester emprisonner de plusieurs heures à plusieurs jours tandis qu'en réponse à certains stimuli (tel un choc de température), l'asque peut se rompre en peu de temps (quelques heures) (Loidl et Lorenz, 2009).

2.5.5. Rôle de la kinase Pat1 dans la régulation du cycle vital chez *S. pombe*

Chez *S. pombe*, la kinase Pat1 détient un rôle clé dans l'enchaînement des événements qui permettent la transition entre la croissance végétative et la sporulation (Beach *et al.*, 1985). En présence d'azote, Pat1 phosphoryle Ste11 et Mei2 de manière constitutive afin de prévenir la formation de zygotes diploïdes et l'initiation du cycle méiotique (Kitamura *et al.*, 2001). Au moment où l'azote devient manquant, Pat1 demeure

active mais parallèlement, différentes voies de signalisation convergent vers Ste11 afin d'en générer un pool actif (Otsubo et Yamamoto, 2012, Yamamoto *et al.*, 2004). À ce moment, le niveau d'activité atteint par Ste11 est suffisant afin d'induire le processus de différenciation sexuelle mais insuffisant afin d'initier le cycle méiotique (via Mei2) (Harigaya *et al.*, 2006, Sukegawa *et al.*, 2011). L'activité de Pat1 est donc essentielle afin que les cellules haploïdes de types sexuels opposés aient l'opportunité de fusionner avant que le cycle méiotique soit déclenché (Beach *et al.*, 1985, Harigaya et Yamamoto, 2007, McLeod et Beach, 1988).

Dans le zygote diploïde, Pat1 est enfin inhibée (par Mei3), ce qui permet la pleine activation de Ste11 et de Mei2, qui deviennent désormais en mesure d'enclencher le cycle méiotique (Li et McLeod, 1996). C'est donc l'inhibition de Pat1 qui, ultimement, permet le déclenchement du cycle méiotique de manière irréversible (Li et McLeod, 1996, McLeod et Beach, 1988). En laboratoire, lorsque l'expression du gène *pat1*⁺ est artificiellement abolie, les cellules s'engagent spontanément dans le cycle méiotique (à partir de leur état haploïde) et ce, même en présence d'azote (Lino et Yamamoto, 1985). Ce phénotype résulte en la production d'ascospores majoritairement non-viables. Par conséquent, Pat1 constitue une importante barrière de protection qui empêche le cycle méiotique de se déclencher à tout moment dans la cellule végétative. Ce mécanisme de régulation semble être essentiel à la survie de *S. pombe* puisqu'en conditions normales de croissance (i.e. à 30°C sur milieu nutritif riche), la souche *pat1*Δ est inviable (Lino et Yamamoto, 1985).

2.5.6. Synchronisation des cellules méiotiques via le système *pat1-114*

En présence d'azote, *S. pombe* croît et se divise grâce au cycle mitotique. Dans ce contexte, une culture de cellules diploïdes est nécessairement composée de populations hétérogènes réparties aléatoirement à travers les quatre phases du cycle mitotique (selon les ratios de phase discutés précédemment). Lorsque l'azote est retiré d'une telle culture, le délai pour qu'il y ait un blocage en G₁ sera donc très variable d'une cellule à l'autre. Étant donné que le cycle méiotique peut exclusivement être déclenché à partir de la phase G₁, la

progression à travers les différentes étapes de la sporulation sera très asynchrone d'une cellule à l'autre (Loidl et Lorenz, 2009).

Par des approches de génétique classique (e.g. mutagenèse aléatoire afin d'observer la complémentation ou la suppression d'un phénotype), différents groupes de recherche ont isolé des séries de mutants qui sporulent spontanément chez *S. pombe*. Dans plusieurs cas, les mutants isolés ont révélé une mutation au locus renfermant le gène *pat1*⁺. Un d'entre eux, le mutant *pat1-114*, exprime une version thermosensible de la kinase Pat1 (Pat1^{ts}). À une température inférieure ou égale à 25°C, Pat1^{ts} est constitutivement active tandis qu'à une température égale ou supérieure à 34°C, celle-ci est rapidement inactivée (Iino et Yamamoto, 1985, Kelly *et al.*, 1988, Lino et Yamamoto, 1985, McLeod et Beach, 1988).

Aujourd'hui, la mutation *pat1-114* est utilisée par l'ensemble de la communauté qui étudie le cycle méiotique chez *S. pombe* (Mata et al., 2002). Cette mutation permet de synchroniser l'entrée des cellules dans le cycle méiotique de sorte que des populations presque parfaitement homogènes sont obtenues à travers les différentes étapes du cycle. Pour ce faire, des souches diploïdes homozygotes pour le type sexuel (*h*⁺/*h*⁺ ou *h*⁻/*h*⁻) et pour la mutation *pat1-114* (*pat1-114*^{+/+}) sont d'abord générées en utilisant le carbendazime, une drogue qui force la duplication du génome. À 25°C, lorsque l'azote est retiré d'une culture *h*⁺/*h*⁺ *pat1-114*^{+/+}, les cellules ne peuvent initier le processus de différenciation sexuelle puisqu'elles sont homozygotes pour le type sexuel et que Pat1^{ts} garde Ste11 et Mei2 inactifs. Ces cellules bloquent donc toutes en G₁ et y demeurent s'il n'y a aucun changement aux conditions de culture. Lorsque cette culture est transférée de la température permissive (25°C) à la température restrictive (34°C), Pat1^{ts} est très rapidement inactivée et ce, en même temps dans toutes les cellules de la culture (Loidl et Lorenz, 2009). Étant donné que les cellules sont toutes bloquées en G₁ lors de l'inactivation de Pat1^{ts}, celles-ci entrent dans le cycle méiotique de manière hautement synchronisée (Bahler *et al.*, 1991).

2.5.7. *S. pombe* comme modèle d'étude du cycle méiotique

L'étude des mécanismes moléculaires qui régulent le cycle méiotique chez les vertébrés s'avère être une tâche très complexe car les principaux systèmes existants sont peu performants (Kim *et al.*, 2010, Li *et al.*, 2010). Par exemple, les cellules germinales provenant de souris déficientes en production d'acide rétinolique peuvent être synchronisées pour leur entrée dans le cycle méiotique, mais celles-ci présentent de très faibles rendements en quantité de matériel biologique (Hogarth et Griswold, 2010). De plus, les techniques *in vitro*, comme celle des cellules germinales en co-culture avec leurs cellules nourricières, les cellules de Sertoli, démontrent très peu de synchronisme au niveau de leur entrée dans le cycle méiotique (Staub, 2001). Par conséquent, les analyses moléculaires nécessitant des quantités appréciables de matériel biologique ou demandant un certain synchronisme sont peu fiables ou pratiquement irréalisables en utilisant ces systèmes.

Heureusement, les étapes principales du cycle méiotique ont été conservées chez la grande majorité des eucaryotes, de la levure à l'homme. Certains organismes modèles, tels que *S. pombe*, sont donc devenus des solutions très intéressantes pour l'étude fondamentale du cycle méiotique (Li *et al.*, 2010). Comme mentionné précédemment, des protocoles simples et efficaces qui permettent la synchronisation de grandes quantités de cellules pour leur entrée dans le cycle méiotique ont été développés chez *S. pombe*. Ajoutée à tous les autres avantages qu'elle présente, cette propriété a fait de la levure à fission un organisme de choix pour l'étude des mécanismes moléculaires qui régulent le cycle méiotique chez les eucaryotes.

2.5.8. Étude du transcriptome méiotique chez *S. pombe*

L'utilisation de micro-puces à ADN couvrant toutes les séquences codantes du génome a permis l'identification du transcriptome lors des événements qui mènent à la production d'ascospores chez *S. pombe* (Mata et al., 2002). Le profil d'expression de chaque gène a été caractérisé de la manière suivante. À chaque heure suite au transfert d'une culture de 25°C à 34°C, le transcriptome de cellules synchronisées pour leur entrée dans le cycle méiotique (i.e. *pat1-114*^{+/+} en absence d'azote) a été comparé à celui de cellules végétatives non-synchronisées (i.e. *pat1*^{+/+} en présence d'azote).

Les résultats de cette étude ont montré que la sporulation est accompagnée d'un programme d'expression génique étendu au cours duquel une grande proportion du génome est soit induite ou réprimée (Mata *et al.*, 2002). De l'inactivation de Pat1^{ts} jusqu'à l'obtention d'ascospores, il s'avère que l'expression de plus de la moitié du génome varie. Le niveau d'expression de près de 2000 gènes est augmenté tandis que celui de plusieurs centaines d'autres est diminué d'au moins deux fois comparativement à leur niveau d'expression dans une cellule végétative (Mata *et al.*, 2002).

Parmi ces gènes, plusieurs subissent une forte induction à un moment précis lors de la progression du cycle méiotique. On observe que ceux dont le niveau d'expression est quatre fois plus élevé dans une cellule méiotique que dans une cellule mitotique (à un temps donné) sont soit très faiblement exprimés, ou pratiquement indétectables en conditions de croissance végétative (Mata *et al.*, 2002). Ces gènes ont donc été définis comme étant « méiose-spécifiques ». Au total, 1033 gènes méiose-spécifiques qui codent pour des protéines également dites « méiose-spécifiques » ont été identifiés chez *S. pombe* (Mata *et al.*, 2002).

Afin d'éviter toute confusion éventuelle, il est à noter qu'un gène dit « méiose-spécifique » ne veut pas signifier « exclusif au cycle méiotique » comme le sous-entend l'expression mais plutôt « fortement induit lors du cycle méiotique ». En ce sens, certains gènes dits méiose-spécifiques sont aussi exprimés lors du cycle méiotique. Souvent, ceux-ci correspondent à des gènes qui sont impliqués dans des processus communs aux deux types de division cellulaire. Par exemple, certains gènes qui sont associés à la réplication de l'ADN ou à la ségrégation des chromatides-sœurs sont définis comme étant méiose-spécifiques même s'ils sont, à un moment clé, exprimés lors du cycle mitotique. Ce phénomène est attribuable au fait que le transcriptome de cellules méiotiques synchronisées a été comparé à celui de cellules mitotiques n'ayant subi aucune synchronisation. Par conséquent, les gènes dont l'expression est restreinte à une certaine phase du cycle mitotique peuvent facilement être sous-représentés dans une population asynchrone. Quoiqu'il en soit, même si certains gènes méiose-spécifiques ne sont pas exclusifs au cycle

méiotique, ceux-ci sont souvent fortement exprimés lors du cycle méiotique et codent généralement pour des protéines dont la fonction est très importante lors de processus qui mènent à la formation d'ascospores.

En analysant le profil d'expression des 1033 gènes méiose-spécifiques, c'est-à-dire en mesurant leur niveau d'expression d'heure en heure, on observe que ceux-ci sont en général exprimés de manière périodique (Mata *et al.*, 2002). En d'autres termes, leur expression est donc à un moment fortement activée et à un autre fortement réprimée.

Plus précisément, on observe que les gènes méiose-spécifiques sont régulés par vagues successives d'expression qui coïncident avec les principales étapes du cycle méiotique et de la sporulation (Mata *et al.*, 2002). Plusieurs études montrent que ces vagues d'expression génique sont entre autre contrôlées par des facteurs de transcription, eux aussi méiose-spécifiques, qui activent l'expression des gènes de la vague en cours et répriment ceux de la vague précédente (Mata *et al.*, 2007). De plus, plusieurs résultats montrent que ces facteurs de transcription interagissent entre eux via des mécanismes de rétroaction positive et négative (Amorim *et al.*, 2010, Mata *et al.*, 2002, Mata *et al.*, 2007, Sukegawa *et al.*, 2011).

Étant donné que la protéine qui fait l'objet de cette thèse joue un rôle important dans la régulation transcriptionnelle de plusieurs gènes méiose-spécifiques, je décrirai, dans la prochaine section, la composition de chacune de ces vagues d'expression génique. J'inclurai aussi les mécanismes moléculaires connus, spécialement ceux de nature transcriptionnelle, qui régulent l'enchaînement de ces vagues d'expression chez la levure à fission.

2.5.9. Vagues d'expression génique lors du cycle méiotique

En fonction de leur profil d'expression, les gènes méiose-spécifiques ont pu être classés en quatre vagues d'expression qui se succèdent de manière précise et ordonnée (Mata *et al.*, 2002). Ceux de la première vague sont qualifiés de « réponse au changement

nutritionnel » et sont induits en réponse à l'absence d'azote et aux phéromones sexuelles. Les gènes de la deuxième vague sont dits « précoces » et correspondent à ceux qui sont exprimés lors de la phase S pré-méiotique (réplication de l'ADN) et de la recombinaison homologue (prophase I). La troisième et plus vaste vague est constituée des gènes « intermédiaires » qui sont eux associés aux deux divisions méiotiques et à la formation de la membrane lipidique des spores (FMS). Finalement, la quatrième et dernière vague comprend les gènes dits « tardifs » et sont, quant à eux, exprimés suite aux divisions méiotiques, c'est-à-dire lors des étapes de maturation des spores (Mata *et al.*, 2002).

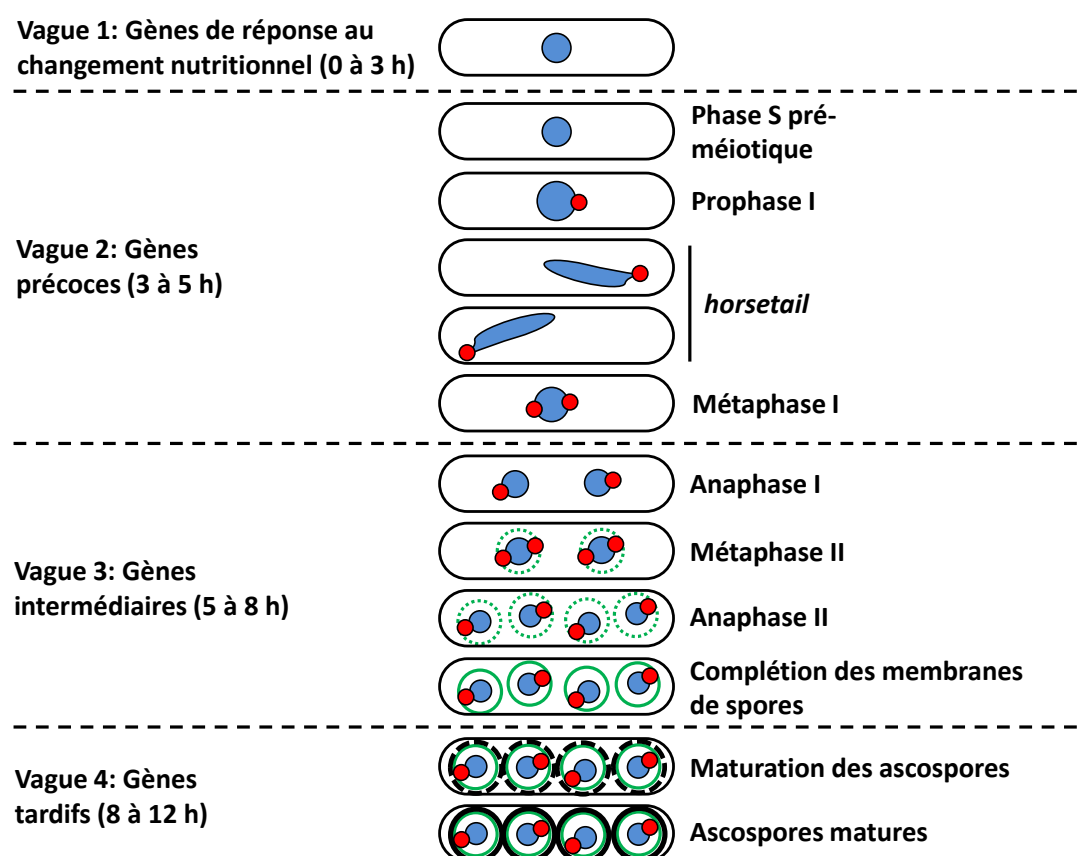


Figure 3. Vagues d'expression génique lors des différentes étapes du cycle méiotique chez *S. pombe*. Illustration du cycle méiotique enclenché à partir d'un système *patI-114* (T_0 h = transfert des cellules de 25°C à 34°C). Les cercles en pointillés verts représentent les membranes de spores en formation tandis que les cercles dont les lignes vertes sont complètes représentent les membranes une fois leur formation complétée. Les parois des spores en maturation sont représentées par des hachurés noirs tandis que les traits noirs complets représentent les parois matures. Les sphères bleues représentent l'ADN nucléaire

tandis que celles en rouges représentent les centrosomes. Dans les trois premières heures suite à l'inactivation de Pat1^{ts}, les gènes de réponse au changement nutritionnel sont induits. Ensuite, les gènes précoces sont exprimés et coïncident avec la duplication du matériel génétique, la recombinaison homologue (*horsetail*) et le début de la méiose I (prophase I). De la première division méiotique (anaphase I) à la formation complète des membranes de spores, ce sont les gènes intermédiaires qui sont exprimés. Finalement, l'expression des gènes tardifs coïncide avec les étapes permettant la maturation des spores.

2.5.9.1. Les gènes de la réponse au changement nutritionnel (1^{re} vague)

Suite à l'inactivation de Pat1^{ts}, environ 250 gènes méiose-spécifiques sont exprimés et font parti des gènes « de réponse au changement nutritionnel » (Mata *et al.*, 2002). Lors de cette première vague, certains gènes sont induits très rapidement suite à l'inactivation de Pat1^{ts}, tandis que d'autres sont induits un peu plus tardivement. Quoiqu'il en soit, l'expression de tous les gènes de cette vague se limite généralement aux deux à trois premières heures suivant l'inactivation de Pat1^{ts}. Parmi les gènes de réponse au changement nutritionnel, on observe trois profils d'expression différents (Mata *et al.*, 2002).

Premièrement, ceux qualifiés de « transitoires » montrent un profil dont l'expression est fortement induite immédiatement suite à l'inactivation de Pat1^{ts} et qui, quelques minutes plus tard, chute drastiquement. Ces gènes sont principalement associés au transport et au métabolisme de l'azote sous forme de sels d'ammonium ou de composés organiques alternatifs tels que l'allantoïne. Un deuxième groupe de gènes comprend ceux dont l'expression est qualifiée de « continue ». Ceux-ci montrent plutôt un profil d'expression qui demeure soutenu du moment où Pat1^{ts} est inactivée jusqu'à l'enchaînement de la phase subséquente d'expression génique (i.e. les gènes précoces). On y retrouve en grande partie des gènes associés à la réponse cellulaire face à différents stress environnementaux. Enfin, le dernier groupe est représenté par les gènes dont l'expression est dite « décalée », c'est-à-dire dont l'expression est induite un peu plus tardivement comparativement aux deux autres groupes. Les gènes décalés regroupent principalement ceux impliqués dans la différenciation sexuelle et l'initiation du cycle méiotique. Ceux-ci incluent, entre autre, ceux retrouvées au locus *mat* (*mat1-Pc/Pm*), ceux codant pour les phéromones sexuelles et leurs récepteurs (*map2/3*⁺) et ceux codant pour des régulateurs clés tels que *ste11*⁺ et *mei2*⁺ (Mata *et al.*, 2002). Différentes études ont permis d'établir que Ste11 est le facteur de transcription qui active l'expression de la grande majorité de des gènes décalés de cette première vague d'expression (Mata et Bahler, 2006, Mata *et al.*, 2002, Otsubo et Yamamoto, 2012, Sugimoto *et al.*, 1991).

Comme mentionné précédemment, Ste11 est un facteur de transcription de type HMG (*high mobility group*), faisant parti de la sous-classe B (HMGB) (Sugimoto *et al.*, 1991). Les membres de cette classe possèdent un domaine de liaison à l'ADN appelé HMG-box (Thomas, 2001). Ce domaine est constitué de trois hélices alpha (séparées par des boucles) qui établissent des contacts directs avec une courte séquence nucléotidique souvent riche en A et/ou T généralement située au niveau du sillon mineur de l'ADN (Stros *et al.*, 2007, Thomas, 2001). Les régulateurs de type HMGB ont généralement une affinité significativement plus grande pour la chromatine lorsque celle-ci est plutôt ouverte que compacte *in vivo* (Stros *et al.*, 2007).

Plusieurs données indiquent que Ste11 s'associe à la chromatine via un motif consensus appelé TR-box (*T Rich-box*) de séquence TCTTTGT (Sugimoto *et al.*, 1991, van Beest *et al.*, 2000). La grande majorité des gènes « décalés » faisant parti de la 1^{re} vague d'expression (~ 80 gènes) possède cette séquence au moins une fois dans leur région promotrice (de -1 à -500) (Mata et Bahler, 2006, Mata *et al.*, 2002). De plus, l'expression de la quasi-totalité des gènes décalés est diminuée d'au moins deux fois en absence de Ste11 (Mata et Bahler, 2006). Ces résultats indiquent que Ste11 est le facteur de transcription principal qui active l'expression des gènes décalés de la première vague d'expression. Les facteurs de transcription qui seraient responsables de l'induction des autres gènes de cette vague (i.e. ceux dits « transitoires » et « continus ») demeurent peu étudiés.

2.5.9.2. Les gènes précoces (2^e vague)

La deuxième vague d'expression est composé des gènes dits « précoces », soit ceux qui sont exprimés pendant les étapes initiales du cycle méiotique (Mata *et al.*, 2002). Plus précisément, l'expression des gènes précoces coïncide avec la réplication de l'ADN et la recombinaison homologe. L'expression de la majorité des gènes précoces se situe de trois à cinq heures suite à l'inactivation de Pat1^{ts} (Mata *et al.*, 2002).

Au total, plus d'une centaine de gènes sont induits lors de cette vague (Mata *et al.*, 2002). La plupart d'entre eux peuvent être classés dans l'une des deux catégories suivantes. La première catégorie est principalement composée de gènes associés à la phase S pré-méiotique et codent donc pour des protéines qui sont impliquées dans la réplication de l'ADN, la condensation de la chromatine et la cohésion des chromosomes. Plusieurs de ces gènes sont également exprimés lors de la phase S mitotique puisque les processus énumérés ci-haut sont communs aux deux types de division cellulaire. La deuxième catégorie est constituée de gènes qui sont pour la plupart exclusivement exprimés lors du cycle méiotique. Ces gènes codent pour des protéines qui sont principalement impliquées dans les processus menant à la recombinaison homologe (e.g. le mouvement *horsetail*, les cassures double-brins et la réparation de l'ADN) (Mata *et al.*, 2002).

L'expression de près de 50% des gènes précoces est affectée (diminuée d'au moins deux fois) en absence du facteur de transcription méiose-spécifique Rep1 (Mata *et al.*, 2007). Ce régulateur possède un domaine de liaison à l'ADN qui reconnaît le motif MluI, soit la séquence ACGCGT (qui correspond en fait au site de restriction de l'enzyme MluI) (Cunliffe *et al.*, 2004). Plusieurs résultats indiquent que Rep1 active directement l'expression de ses gènes cibles en faisant parti d'un complexe protéique incluant Cdc10 et Res2 (Cunliffe *et al.*, 2004, Ding et Smith, 1998, Sugiyama *et al.*, 1994). Lors du cycle mitotique, Cdc10, Res1, Res2 et Rep2 forment le complexe DSC1 (aussi appelé MBF pour *MluI binding factor*) et régulent l'expression d'une multitude de gènes à la transition G₁/S (Lowndes *et al.*, 1992, White *et al.*, 2001). Divers résultats soutiennent que Rep1 serait la sous-unité d'une version méiose-spécifique du complexe DSC1 (i.e. dépourvue des sous-unités Res1 et Rep2) (Cunliffe *et al.*, 2004, Ding et Smith, 1998).

L'expression du gène *rep1*⁺ est dépendante du facteur de transcription Ste11 (Mata et Bahler, 2006). En absence de Ste11, l'expression de *rep1*⁺, mais aussi de la majorité des autres gènes précoces, est significativement réduite ou abolie (Mata et Bahler, 2006). Conséquemment, en absence de Ste11, la phase S pré-méiotique ne peut être entamée. De plus, la présence de Rep1 est requise afin que l'expression des gènes « décalés » de la première vague soit réprimée avant l'initiation de la phase S pré-méiotique (Mata *et al.*,

2007). En effet, on observe qu'en absence de Rep1, l'expression de plusieurs gènes décalés (dont *ste11*⁺) demeure anormalement élevée lors de temps méiotiques qui coïncideraient normalement avec la réplication de l'ADN. Ces données illustrent la présence de mécanismes de rétroaction positive et négative entre Ste11 et Rep1 afin de contrôler l'enchaînement des vagues d'expression génique lors du programme méiotique.

2.5.9.3. Les gènes intermédiaires (3^e vague)

L'expression des gènes de la troisième vague coïncide avec les deux divisions méiotiques et la formation de la membrane lipidique des spores (Mata *et al.*, 2002). Ces gènes sont dits « intermédiaires » puisqu'ils sont exprimés lors des événements qui se déroulent en mi-parcours de processus méiotique. Au total, 561 gènes intermédiaires ont été identifiés, ce qui représente environ 60% de la totalité des gènes méiose-spécifiques. La troisième vague d'expression représente donc celle qui renferme le nombre le plus important de gènes méiose-spécifiques. Étant donné que la protéine à l'étude dans cette thèse fait parti de cette vague, les mécanismes qui sont associés à la troisième vague seront davantage détaillés que ceux associés aux autres vagues d'expression génique.

Les gènes intermédiaires codent pour des protéines qui interviennent majoritairement au cours des divisions méiotiques (Mata *et al.*, 2002, Mata *et al.*, 2007). Parmi ces gènes, certains codent pour des protéines qui sont également impliqués lors du cycle mitotique. Par exemple, certains gènes codant pour des protéines qui contrôlent la progression du cycle mitotique, tels que *cdc25*⁺ (qui code pour une tyrosine phosphatase) et *cdc13*⁺ (qui code pour une cycline de type B), sont aussi fortement induits lors des divisions méiotiques. Les gènes codant pour les composantes du centrosome (e.g. *sad1*⁺, *kms1*⁺, *kms2*⁺) et les principales kinases qui contrôlent la ségrégation du matériel génétique lors du cycle mitotique (e.g. *plo1*⁺, *ark1*⁺ et *fin1*⁺) représentent également d'autres exemples. Différentes études ont permis d'établir que ces protéines sont critiques à l'enchaînement des méioses I et II, indiquant que la ségrégation du matériel génétique lors des deux types de division cellulaire nécessite l'action de protéines communes.

Notamment, plus d'une trentaine de gènes intermédiaires sont associés au trafic vésiculaire et à la morphogenèse de la cellule (Mata *et al.*, 2002). Parmi eux, certains codent pour des protéines qui sont d'ailleurs essentielles à la formation de la membrane des spores, tels que *spo3⁺* et *psy1⁺*. Lors des divisions méiotiques, on observe que la protéine Psy1 est transloquée de la membrane plasmique à celle des spores en formation (Maeda *et al.*, 2009, Nakamura *et al.*, 2001). Par conséquent, la protéine de fusion GFP-Psy1 est souvent utilisée comme marqueur de la membrane des spores chez *S. pombe*. De plus, plusieurs gènes codant pour différentes protéines impliquées dans les sentiers de sécrétion vésiculaire, telles que celles de la famille des SNARE, SNAP et Rab, sont fortement induits lors des divisions méiotiques (Mata *et al.*, 2002, Shimoda, 2004). Plusieurs résultats indiquent que ces protéines interviennent également lors de la formation de la membrane des spores (Kashiwazaki *et al.*, 2011, Shimoda, 2004).

Il est à noter qu'une multitude de gènes intermédiaires codent pour des protéines dont la fonction demeure encore aujourd'hui non-élucidée. Certains d'entre eux ont néanmoins été annotés en fonction de séquences similaires que l'on retrouve au niveau de leur région promotrice. À titre d'exemple pertinent pour cette thèse, un total de 25 gènes intermédiaires ont été annotés *wtf1⁺-25⁺* (*with tf* qui signifie *with transposon of fission yeast*). Ceux-ci possèdent tous une séquence d'environ 300 nucléotides, au niveau de leur région promotrice, qui découle et provient du même rétrotransposon. De nombreux gènes ont également pu être annotés en fonction de signatures protéiques communes dont la fonction reste néanmoins totalement inconnue. C'est le cas de celles qui portent l'annotation DUF (*Domain of Unknown Function*). Celles-ci sont nombreuses parmi les protéines codées par les gènes intermédiaires.

L'expression de la grande majorité des gènes intermédiaires est activée par Mei4, qui, comme Ste11 et Rep1, constitue également un facteur de transcription exclusivement présent lors du cycle méiotique (Horie *et al.*, 1998, Mata *et al.*, 2007). L'expression de plus de 90% de l'ensemble des gènes intermédiaires est réduite d'au moins deux fois en absence de Mei4 (Mata *et al.*, 2007). Notamment, l'expression de la plupart des gènes dont l'expression est Mei4-dépendante est totalement abolie dans un mutant *mei4Δ/Δ* (Abe et

Shimoda, 2000, Mata *et al.*, 2007). Ces données indiquent que Mei4 est un activateur clé de l'expression des gènes intermédiaires. De plus, la présence de Mei4 est essentielle au déroulement des divisions méiotiques. En absence de Mei4, le cycle méiotique bloque en métaphase I : les divisions méiotiques sont absentes et aucune ascospore n'est produite (Murakami-Tonami *et al.*, 2007).

Mei4 possède un domaine de liaison à l'ADN de type *winged-helix* qui correspond en fait à une variante du domaine *helix-turn-helix* (Horie *et al.*, 1998). Les trois hélices alpha du domaine *winged-helix* sont accompagnées de deux feuillets bêta additionnels, positionnés des côtés extérieurs du noyau d'hélices, ce qui leur donnent l'aspect d'être pourvues d'ailes, d'où l'attribution du terme « *winged* » (Lehmann *et al.*, 2003, Overdier *et al.*, 1994). Les facteurs de transcription qui possèdent ce domaine de liaison à l'ADN sont communément appelés *forkhead* (Fkh) et les membres de cette famille sont universellement annotés *Fox* (pour *Forkhead box*, d'après une convention établie depuis 2000) (Kaestner *et al.*, 2000).

Différents facteurs de transcription de type Fkh sont retrouvés chez de nombreux organismes, de la levure à l'homme (Benayoun *et al.*, 2011). Leur domaine de liaison à l'ADN s'étend sur une centaine de résidus assez bien conservés, dans leur portion N-terminale, tandis que leur portion C-terminale constitue généralement leur domaine d'activation ou de répression et varie énormément d'un membre à l'autre (Lehmann *et al.*, 2003, Overdier *et al.*, 1994).

Les régulateurs de type Fkh sont impliqués dans une grande diversité de processus biologiques (Benayoun *et al.*, 2011, Lehmann *et al.*, 2003, Tuteja et Kaestner, 2007). Chez l'humain, plus de 40 facteurs de transcription de type Fkh ont été identifiés. La découverte initiale de sept facteurs Fkh, annotés FREAC1-7, a permis d'établir que ce domaine se lie directement à l'ADN via un motif composé de la séquence consensus RTAAAYA (où R représente une purine G ou A et Y représente une pyrimidine C ou T) (Pierrou *et al.*, 1994).

Lors d'essais *in vitro* de rétention sur gel, il a été démontré que Mei4 se lie à des séquences nucléotidiques qui possèdent un motif GTAAACA (Abe et Shimoda, 2000, Horie *et al.*, 1998, Pierrou *et al.*, 1994). Ce motif a été nommé FLEX, en référence au motif identifié dans le cas des protéines FREAC (FLEX constitue en fait un acronyme de *FREAC-like element of spo6*). De plus, ces essais *in vitro* ont montré que Mei4 possède encore plus d'affinité pour le motif FLEX lorsque celui-ci est suivi des nucléotides AACA en son extrémité en 3' (Abe et Shimoda, 2000). Une analyse des régions promotrices (de -1 à -500) de l'ensemble des gènes intermédiaires révèle que seulement 30% d'entre eux possèdent au moins une copie du motif FLEX (Mata *et al.*, 2002). Par contre, des données *in vivo* d'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) ont révélé que Mei4 est en mesure de s'associer à une forme plus dégénérée du motif FLEX. En effet, ces données indiquent que similairement aux protéines FREAC, Mei4 possède la capacité de se lier au motif consensus RTAAAYA (Moldon *et al.*, 2008). De plus, des essais de ChIP à l'échelle génomique (ChIP-seq) ont révélé que Mei4 est physiquement associée aux régions promotrices d'au moins 60% des gènes intermédiaires au tout début de la 3^e vague transcriptionnelle (Alves-Rodrigues *et al.*, 2016). Dans leur ensemble, ces résultats indiquent que Mei4 est le régulateur transcriptionnel qui est principalement responsable de l'activation directe des gènes intermédiaires lors de la troisième vague d'expression du cycle méiotique.

Chez *S. pombe*, on retrouve trois autres facteurs de transcription qui possèdent un domaine de liaison à l'ADN de type *forkhead*, soit Fkh2, Fhl1 et Sep1 (Szilagyi *et al.*, 2005). Différentes études ont montré que ces trois régulateurs sont impliqués dans la régulation de gènes qui sont périodiquement exprimés lors de la croissance végétative (Bahler, 2005, Buck *et al.*, 2004, Bulmer *et al.*, 2004, Szilagyi *et al.*, 2005). Par contre, de plus récentes études indiquent que Fhl1 et Fkh2 sont également impliquées dans la régulation de gènes méiose-spécifiques (Alves-Rodrigues *et al.*, 2016, Chen *et al.*, 2012, Pataki *et al.*, 2016). Notamment, plusieurs résultats montrent que Fkh2 est impliqué dans la répression de plusieurs gènes intermédiaires méiose-spécifiques lors de la croissance végétative (Chen *et al.*, 2012). En effet, lors du cycle mitotique, Fkh2 réprime l'expression d'un sous-groupe de gènes intermédiaires. De plus, plusieurs résultats indiquent que Fkh2

est également active pendant les deux premières phases du cycle méiotique afin de réprimer l'expression de ce sous-groupe de gènes intermédiaires. Selon un mécanisme toujours inconnu, lors des divisions méiotiques, Mei4 déplace Fkh2 de la chromatine afin d'activer l'expression de la plupart des gènes intermédiaires réprimés par Fkh2 (Alves-Rodrigues *et al.*, 2016).

En absence de Mei4, la grande majorité des gènes précoces demeurent fortement exprimés à des temps méiotiques durant lesquels normalement, les gènes intermédiaires devraient être exprimés (Mata *et al.*, 2007). De plus, Mei4 active sa propre transcription de même que celle des gènes qui codent pour les facteurs de transcription (e.g. *atf21⁺*, *atf31⁺* et *rsv2⁺*) responsables de l'induction des gènes de la vague subséquente, soit celle des gènes tardifs (Abe et Shimoda, 2000, Mata *et al.*, 2007). Ces données indiquent que Mei4 est également impliquée dans des mécanismes de rétroaction positive et négative qui coordonnent l'enchaînement des vagues d'expression génique lors de la progression du cycle méiotique.

Même si les gènes intermédiaires atteignent pour la plupart un niveau maximal d'expression qui se situe autour de six heures suite à l'inactivation de Pat1^{ts}, ceux-ci peuvent quand même être divisés en deux sous-classes selon leur profil d'expression (Amorim *et al.*, 2010). Une première classe est dite à « diminution rapide », c'est-à-dire dont l'expression chute très rapidement suite à leur induction. Ceux-ci montrent un profil dont l'expression est assez restreinte dans le temps (i.e. qui se situe entre les temps 5 et 7 heures suite à l'inactivation de Pat1^{ts}). Une deuxième classe est dite à « diminution lente », c'est-à-dire dont l'expression demeure plus soutenue au cours des divisions méiotiques. Ceux-ci montrent un profil dont l'expression est généralement plus élevée et étendue comparativement à ceux à diminution rapide (i.e. qui s'étend généralement de 4 à 9 h suite à l'inactivation de Pat1^{ts}).

Plusieurs données montrent que les gènes intermédiaires dits à « diminution lente » sont régulés par un mécanisme de régulation de nature post-transcriptionnelle impliquant la protéine Meu5 (Amorim *et al.*, 2010). En effet, au début de la MI, Mei4 active l'expression

du gène méiose-spécifique *meu5*⁺ qui code pour une protéine possédant trois domaines de liaison à l'ARN de type RRM (*RNA recognition motif*) (Amorim *et al.*, 2010, Mata *et al.*, 2007). Au cours des divisions méiotiques, Meu5 se lie à différents transcrits intermédiaires et les stabilise de manière à prolonger leur présence jusqu'à la toute fin des divisions méiotiques et de la formation de la membrane des spores (Amorim *et al.*, 2010).

En absence de Meu5, le niveau d'expression des gènes intermédiaires à « diminution lente » est significativement moins élevé et chute durant les divisions méiotiques. En effet, dans un mutant *meu5Δ/Δ*, l'expression de 188 transcrits intermédiaires est réduite d'au moins deux fois au cours des divisions méiotiques (Amorim *et al.*, 2010). Ces observations illustrent la présence de boucles de régulation positive entre les mécanismes de régulation de nature transcriptionnelle (Mei4) et post-transcriptionnelle (Meu5) lors du cycle méiotique chez *S. pombe*.

La progression des divisions méiotiques est également régulée par des mécanismes de nature post-traductionnelle. En effet, afin que les différents événements cellulaires qui permettent la ségrégation successive des paires de chromosomes homologues et de chromatides-sœurs, différentes protéines doivent être produites et ensuite dégradées (Duncan et Mata, 2014). La protéolyse de molécules spécifiques lors des divisions méiotiques est principalement contrôlée par l'*anaphase promoting complex* (APC), aussi appelé le « cyclosome » (Pesin et Orr-Weaver, 2008). L'APC/cyclosome est un complexe multi-protéique composé de dix sous-unités, dont une possédant une activité E3 ubiquitine ligase. Lors des divisions méiotiques, l'APC/cyclosome se lie à différentes cibles afin d'induire leur dégradation au moment opportun via le protéasome (Kimata *et al.*, 2011).

Au cours des divisions méiotiques, les dix gènes qui codent pour les composantes de l'APC/cyclosome sont tous fortement induits (Mata *et al.*, 2002). L'activité et la spécificité de l'APC/cyclosome est influencée par différentes protéines régulatrices (Pesin et Orr-Weaver, 2008). Chez *S. pombe*, le gène méiose-spécifique *fzr1*⁺ (aussi appelé *mfr1*⁺) code pour une protéine de la famille *fizzy-related* et régule l'activité et la spécificité de l'APC/cyclosome (Asakawa *et al.*, 2001, Blanco *et al.*, 2001). Au terme de la méiose II,

Fzr1 se complexe à l'APC/cyclosome et module sa spécificité de sorte à recruter la cycline Cdc13 pour que celle-ci soit ubiquitinée et rapidement dégradée (Aoi *et al.*, 2013, Izawa *et al.*, 2005, Kimata *et al.*, 2011, Kimata *et al.*, 2008). Ce mécanisme protéolytique assure l'inactivation de Cdk1 et l'arrêt des processus permettant la ségrégation du matériel génétique. En absence de Fzr1, le complexe Cdc13-Cdk1 demeure actif au-delà de la méiose II et une troisième division méiotique aberrante se produit, ce qui résulte en une diminution significative de la viabilité des ascospores (Aoi *et al.*, 2013).

2.5.9.4. Les gènes tardifs (4^e vague)

La quatrième et dernière vague de gènes méiose-spécifiques regroupe ceux qui sont qualifiés de « tardifs » puisque leur expression coïncide avec les étapes qui se produisent à la toute fin du cycle méiotique (Mata *et al.*, 2002). Au total, on compte plus de 130 gènes qui sont induits suite aux divisions méiotiques, soit à partir de 8-9 heures après l'inactivation de Pat1^{ts}. La plupart des gènes tardifs atteignent un niveau maximal d'expression lors des étapes associées à la maturation des spores. Les gènes tardifs qui codent pour des protéines dont on connaît le rôle sont souvent impliqués dans la réponse au stress, la maturation des spores, la dormance et la germination (Mata *et al.*, 2002). Globalement, les gènes tardifs sont les gènes méiose-spécifiques dont les fonctions sont les moins bien caractérisées de tout le processus de sporulation.

Plusieurs données indiquent que l'expression des gènes tardifs est activée par une combinaison de facteurs de transcriptions méiose-spécifiques (Mata *et al.*, 2002, Mata *et al.*, 2007). Lors des divisions méiotiques, Mei4 active l'expression des gènes *atf21*⁺ et *atf31*⁺, qui eux codent pour des facteurs de transcription de la famille des *activating transcription factor* (ATF) (Mata *et al.*, 2002, Ohmiya *et al.*, 1999). Leur domaine de liaison à l'ADN est constitué d'un motif *basic leucine zipper* (bZIP) et la plupart de leurs membres régulent l'expression génique sous forme d'homo- ou d'hétéro-dimères (Karin et Smeal, 1992, van Dam et Castellazzi, 2001).

Chez *S. pombe*, l'expression d'environ 55% des gènes tardifs est significativement diminuée en absence d'Atf21 ou d'Atf31 (Mata *et al.*, 2002). La comparaison du transcriptome des cellules *atf21Δ/Δ* et *atf31Δ/Δ* a permis de constater que ces deux facteurs régulent en partie le même sous-ensemble de gènes tardifs. En fait, tous les gènes Atf31-dépendants sont aussi régulés par Atf21, tandis qu'Atf21 en régule une partie à lui seul (Mata *et al.*, 2002). Ces observations suggèrent qu'Atf21 régule l'expression des gènes tardifs probablement sous forme d'hétéro-dimère (avec Atf31 ou d'autres facteurs bZIP) ou d'homo-dimère. Une vingtaine de gènes tardifs sont sous le contrôle d'un troisième facteur de transcription, Rsv2, qui possède un motif de liaison à l'ADN en doigt de zinc de type C₂H₂ (Mata *et al.*, 2007). Même si aucun motif clair de liaison n'a été identifié pour Rsv2, ces cibles transcriptionnelles correspondent majoritairement à des gènes associés à la réponse au stress.

3. Découverte de la protéine Cuf2 chez *S. pombe*

3.1. L'importance de l'ion de cuivre chez les organismes vivants

Le cuivre (Cu) est un micronutriment qui est essentiel chez tous les organismes aérobiques (Kim *et al.*, 2008). Ce métal de transition peut autant être retrouvé sous sa forme oxydée (Cu²⁺) que réduite (Cu¹⁺). Sa capacité à pouvoir facilement accepter ou donner un électron en fait un cofacteur de choix, spécialement dans les réactions d'oxydoréduction. En effet, cet ion métallique est retrouvé dans le centre catalytique de différentes enzymes impliquées dans divers processus cellulaires critiques tels que la production d'énergie, la protection contre les espèces réactives de l'oxygène et l'acquisition du fer (un second micronutriment essentiel pour la cellule) (Kim *et al.*, 2008). De plus, des études récentes ont démontré que la présence du Cu est essentielle pour une grande variété de processus physiologiques vitaux tels que la coagulation sanguine, le transport de l'oxygène, la synthèse de neurotransmetteurs et de peptides hormonaux et le développement embryonnaire (Kaplan et Maryon, 2016). Des désordres liés à l'apport ou la distribution du Cu dans la cellule sont associés à de multiples pathologies, telles que les

maladies de Menkes et de Wilson, le cancer, l'Alzheimer, ainsi que le diabète (Kim *et al.*, 2008).

Comme la plupart des oligo-éléments, le Cu peut également causer une toxicité s'il est retrouvé en trop grande concentration. Une quantité intracellulaire incontrôlée de Cu peut mener à l'hydrolyse du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) en ion hydroxyde (OH^-) et radical hydroxyle (OH^\bullet) selon la réaction de Fenton ($\text{Cu}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Cu}^{1+} + \text{OH}^- + \text{OH}^\bullet$). Les radicaux hydroxyles produits sont potentiellement très toxiques pour la cellule puisque ceux-ci se retrouvent alors libres de réagir avec plusieurs types de molécules (e.g. lipides, protéines et ADN), engendrant ainsi des modifications qui altèrent leurs fonctions. Afin d'éviter ce scénario, une concentration intracellulaire adéquate en Cu doit être maintenue. Les organismes ont donc développé divers mécanismes homéostatiques qui contrôlent l'entrée et la distribution cellulaire du Cu afin d'en maintenir des quantités suffisantes et d'en prévenir les effets toxiques (Kaplan et Maryon, 2016, Kim *et al.*, 2008).

3.2. L'homéostasie du Cu chez les eucaryotes

L'utilisation d'organismes modèles a permis la découverte et la caractérisation de nombreuses protéines impliquées dans l'acquisition et la distribution du Cu (Kim *et al.*, 2008, Labbe et Thiele, 1999). Plusieurs de ces protéines ont initialement été identifiées chez la levure à bourgeon *S. cerevisiae*. Par homologie de séquence, certaines d'entre elles ont pu être, par la suite, identifiées chez une variété d'autres organismes y compris *S. pombe* (Rees et Thiele, 2004). Une série d'expériences de complémentation génétique a permis de découvrir que la fonction de plusieurs de ces protéines est conservée à travers les espèces, de la levure à l'homme (Kim *et al.*, 2008, Labbe et Thiele, 1999).

Chez les eucaryotes, le transport du Cu est principalement réalisé par les protéines de la famille des Ctr (*copper transporter*) (Labbe et Thiele, 1999, Nevitt *et al.*, 2012). Chaque monomère de Ctr est composé de trois domaines transmembranaires et de deux courtes portions non-structurées qui constituent leurs queues N- et C-terminales. Plusieurs

données indiquent que les Ctr transportent le Cu à travers les membranes lipidiques sous forme d'homo ou d'hétérotrimères (Labbe et Thiele, 1999, Nevitt *et al.*, 2012).

La majorité des transporteurs membres de la famille des Ctr ont une très haute affinité pour l'ion de Cu. Leur portion N-terminale contient généralement un ou plusieurs motifs Met (Kim *et al.*, 2008, Nevitt *et al.*, 2012). Ces motifs conservés sont constitués de courtes séquences riches en méthionine, d'un arrangement MxM ou MxxM (où M représente une méthionine et X n'importe quel acide aminé) (Koch *et al.*, 1997). Les résultats de plusieurs études montrent que ces motifs captent et coordonnent les ions de Cu avec une très grande affinité et facilitent leur transport à travers les membranes (Kim *et al.*, 2008, Nevitt *et al.*, 2012).

Une fois transportés, les ions de Cu sont immédiatement pris en charge par différentes chaperonnes spécifiques. Plusieurs d'entre elles sont aussi conservées à travers les espèces. Ce sont ces chaperonnes (avec l'aide de molécules de glutathion) qui permettent l'acheminement du Cu aux différentes enzymes qui le requiert et par le fait même, qui contribuent à empêcher la présence d'ions de Cu libres potentiellement toxiques pour la cellule (Kim *et al.*, 2008, Nevitt *et al.*, 2012).

Dans les prochaines sections et sous-sections, je décrirais le plus brièvement possible le rôle des principales protéines impliquées dans l'homéostasie du Cu qui ont menées à l'identification de la protéine à l'étude dans cette thèse, soit Cuf2.

3.2.1. La régulation de l'homéostasie du Cu chez *S. cerevisiae*

Chez la levure à bourgeon, plusieurs études ont montré que l'homéostasie du Cu est maintenue grâce aux facteurs de transcription Mac1 et Ace1 (Jungmann *et al.*, 1993, Rees et Thiele, 2004, Thiele, 1988). Bien que les gènes qui codent pour ces deux régulateurs soient exprimés de manière constitutive, leur activité est, quant à elle, sensible aux niveaux de Cu présent dans le milieu. En condition de carence de Cu, Mac1 active entre autre l'expression des gènes *CTR1* et *CTR3* (Labbe et al., 1997, Rees et Thiele, 2004). Chez *S.*

cerevisiae, Ctr1 et Ctr3 permettent l'entrée de Cu via la formation d'homotrimères à la membrane cellulaire tandis qu'une troisième composante, Ctr2, se localise à la membrane de la vacuole afin d'en mobiliser les réserves en ions Cu (Dancis *et al.*, 1994, Knight *et al.*, 1996, Rees *et al.*, 2004). Dans cette condition, le facteur de transcription Ace1 demeure inactif et ses gènes cibles ne sont pas exprimés.

En conditions de surplus de Cu, l'activité de Mac1 est abolie tandis qu'Ace1 devient active (Labbe *et al.*, 1997, Thiele, 1988). En se liant à des résidus cystéines spécifiques dans chacune des protéines, le Cu inactive Mac1 tandis qu'il active la capacité d'Ace1 à transactiver ses gènes cibles (Hu *et al.*, 1990, Jensen et Winge, 1998, Koch *et al.*, 1997, Serpe *et al.*, 1999, Winge, 1998). En surplus de Cu, Ace1 active l'expression du gène *CUP1*, qui code pour une métallothionéine responsable de la détoxification du Cu. Cup1 est une protéine de faible poids moléculaire qui possède plusieurs copies de motifs riche en cystéines, lui permettant de lier plusieurs atomes de Cu avec une très haute affinité. En surplus de Cu, Cup1 permet donc aux cellules de séquestrer l'excès de cet ion métallique et de résister aux effets toxiques que l'ion pourrait engendrer s'il se retrouvait libre à l'intérieur de la cellule (Winge, 1998).

3.2.2. La régulation de l'homéostasie du Cu chez *S. pombe*

Par homologie de séquence aux protéines retrouvées chez *S. cerevisiae*, les principales composantes de l'homéostasie du Cu ont également pu être identifiées chez *S. pombe* (Beaudoin *et al.*, 2013). Entre autre, trois protéines membres de la famille des Ctr sont présentes, soit Ctr4, Ctr5 et Ctr6. De plus, deux protéines qui possèdent des similarités de séquences aux régulateurs Ace1 et Mac1 ont été identifiées et nommées Cuf1 et Cuf2 (en référence à *Cu-factor*). Au laboratoire, plusieurs travaux de recherche visant à caractériser le rôle de ces protéines dans l'homéostasie du Cu ont été réalisés.

Cuf1 est une protéine de 411 acides aminés, de poids moléculaire prédit de 45,5 kDa (Labbe *et al.*, 1999). Plusieurs données démontrent que Cuf1 constitue l'orthologue fonctionnel de la protéine Mac1 de *S. cerevisiae* (Beaudoin et Labbe, 2001, Beaudoin *et al.*,

2003, Labbe et al., 1999). Le gène *cuf1*⁺ est exprimé de manière constitutive mais sa capacité à transactiver l'expression de ses gènes cibles est dépendante du statut en Cu, tout comme Mac1 (Labbe *et al.*, 1999). En conditions de carence de Cu, Cuf1 active l'expression des gènes *ctr4*⁺, *ctr5*⁺ et *ctr6*⁺ (Beaudoin et Labbe, 2001, Bellemare *et al.*, 2002, Labbe *et al.*, 1999, Zhou et Thiele, 2001). Ctr4 et Ctr5 permettent l'entrée de Cu via la formation d'un hétérotrimère à la membrane cellulaire, selon un ratio de 2 monomères de Ctr4 pour un monomère de Ctr5 (Ioannoni *et al.*, 2010, Zhou et Thiele, 2001). Parallèlement, Ctr6 forme un homotrimère qui permet de mobiliser les réserves de Cu de la vacuole vers les enzymes Cu-dépendantes (Bellemare *et al.*, 2002). En surplus de Cu, Cuf1 est spécifiquement inactivée par le Cu et subit un changement de conformation qui permet à l'exportine Crm1 de l'exclure du noyau (Beaudoin et Labbe, 2006, Beaudoin et Labbe, 2007, Beaudoin *et al.*, 2003).

Cuf2, quant à elle, est une petite protéine de 177 acides aminés, d'un poids moléculaire prédit de 20,1 kDa (Ioannoni *et al.*, 2012). Son homologie de séquence avec Cuf1 (et les autres facteurs de transcription impliqués dans l'homéostasie du Cu) réside principalement dans sa portion N-terminale, au niveau de ses résidus 1 à 60. Les acides aminés compris dans cette portion sont à 42% identiques et à 62% similaires à ceux retrouvés dans la portion équivalente à Cuf1 (acides aminés 1 à 61) (Ioannoni *et al.*, 2012). Les résidus parfaitement conservés entre Cuf1 et Cuf2 correspondent principalement à des cystéines (Cys), histidines (His), lysines (Lys) et arginines (Arg). Chez les facteurs de transcription sensibles au Cu (e.g. Ace1, Mac1 et Cuf1), les résidus Cys et His sont souvent associés avec la coordination d'ions métalliques tandis que les résidus basiques Lys et Arg sont plutôt associés à des fonctions leur permettant de lier l'ADN ou d'entrer au noyau (Koch *et al.*, 1997, Nevitt *et al.*, 2012, Rees et Thiele, 2004, Winge, 1998).

La portion N-terminale de Cuf2 contient au total 9 résidus Lys et Arg qui sont conservés avec Cuf1 (Ioannoni *et al.*, 2012). Des résultats montrent que 6 de ces 9 résidus conservés sont impliqués dans la capacité de Cuf1 de se rendre au noyau en condition de carence de Cu (Beaudoin et Labbe, 2006). La portion N-terminale de Cuf2 contient également un motif Cys-X₂-Cys-X₈-Cys-X-His qui est parfaitement conservé chez

plusieurs facteurs Cu-sensibles, dont Ace1, Mac1, Cuf1 mais aussi Amt1, l'orthologue fonctionnel d'Ace1 chez la levure *Candida glabrata* (Ioannoni *et al.*, 2012, Zhou et Thiele, 1991). Selon des résultats obtenus pour Amt1, ce motif lierait un atome de zinc et ferait parti d'un module structuré par cet ion (acides aminés 1 à 39 pour Cuf2) qui établirait un contact direct avec l'ADN, principalement au niveau du sillon mineur de la double hélice (Farrell *et al.*, 1996, Turner *et al.*, 1998, Winge *et al.*, 1998). De plus, ce module comprend un motif (R/K)GRP qui est conservé chez tous ces facteurs sensibles au Cu, qui correspond aux résidus 36 à 39 de Cuf2 (Ioannoni *et al.*, 2012). Ce motif est également retrouvé chez les facteurs de transcription de type HMGA (*high mobility group A*), aussi appelés HMG-I(Y) (Reeves, 2001, Sgarra *et al.*, 2004). Selon certaines études, ce motif, appelé *AT-hook*, est impliqué dans le contact direct de séquences nucléotidiques riches en A et en T généralement situées dans le sillon mineur de la double hélice d'ADN (Huth *et al.*, 1997, Reeves et Nissen, 1990). Globalement, ces observations suggèrent que Cuf2 pourrait potentiellement être un facteur de transcription qui s'associe directement avec l'ADN.

Même si Cuf2 présente plusieurs similarités avec les facteurs de transcription sensibles au Cu décrits ci-haut, cette protéine ne possède pas la seconde moitié du domaine retrouvé chez Ace1 et Amt1, domaine dans lequel deux motifs CxC supplémentaires sont présents (Ioannoni *et al.*, 2012). Ces deux motifs supplémentaires permettent, avec l'aide de deux autre paires de cystéines (qui elles sont présentes chez Cuf2), la formation d'une structure liée au Cu qui fournit la capacité à Ace1 et Amt1 de transactiver leurs gènes cibles en surplus de Cu (Dameron *et al.*, 1991, Graden *et al.*, 1996, Thorvaldsen *et al.*, 1994, Winge *et al.*, 1998). L'absence de ces deux motifs supplémentaires CxC rend improbable la formation d'un domaine dont l'activité transactivatrice est régulée par l'ion de Cu pour Cuf2. De plus, en opposition à Cuf1 et Mac1, Cuf2 ne possède les motifs riches en Cys (situés dans leur extrémité C-terminale) qui détectent et coordonnent les ions de Cu et par le fait même, inactivent leur fonction. En fait, la portion C-terminale de Cuf2 semble être dépourvue de tout motif potentiel qui pourrait lier les ions de Cu (Ioannoni *et al.*, 2012). Des recherches par alignement de séquences protéiques (BLASTp) se sont avérées infructueuses dans la découverte de motifs qui auraient pu être rattachés à une fonction connue. Bien qu'il soit cohérent que Cuf2 ait un rôle dans la régulation de l'expression

génique, l'ensemble de ces observations semblent indiquer que cette fonction pourrait être dans un contexte différent que celui de l'homéostasie du Cu.

4. Préambule, hypothèse et objectifs

Avant les travaux décrits dans cette thèse, très peu de données expérimentales étaient disponibles concernant la fonction de Cuf2. La seule donnée présente dans la littérature provenait de l'étude du transcriptome méiotique. Ces travaux indiquent que *cuf2*⁺ correspondait à un gène méiose-spécifique de la vague des gènes intermédiaires, soit un gène qui serait fortement induit lors des divisions méiotiques (Mata *et al.*, 2002).

Mes travaux de thèse ont initialement consisté à identifier le rôle de Cuf2 dans la cellule. Selon les données du transcriptome méiotique, Cuf2 pouvait potentiellement avoir un rôle lors du cycle méiotique et en considérant l'ensemble des observations au niveau de sa séquence protéique, il était probable que Cuf2 soit impliquée dans la régulation de l'expression génique. Par conséquent, l'objectif de mes études doctorales a été de 1- d'identifier le rôle de Cuf2 dans la cellule (Ioannoni *et al.*, 2012), et par la suite 2- d'identifier son mécanisme d'action (Ioannoni *et al.*, 2016).

ARTICLE 1

Cuf2 is a novel meiosis-specific regulatory factor of meiosis maturation

Auteurs de l'article :

Raphael Ioannoni, Jude Beaudoin, Luis Lopez-Maury, Sandra Codlin, Jürg Bähler et Simon Labbé.

Statut de l'article :

Publié dans PloS one. 2012; 7(4): e36338. doi: 10.1371.

Avant-propos :

Contributions et participation

Dans le cadre de ce manuscrit, j'ai réalisé plus de 80% du travail expérimental. L'expérience de micropuces à ADN a été effectuée par le groupe anglais formé de LLM, SD et J. Bähler. L'analyse des données transcriptomiques a été faite conjointement par Alexandre Mercier, J. Beaudoin, LLM, SL et RI. Les outils moléculaires utilisés (souches et plasmides) ont été construits conjointement par SL, J. Beaudoin et RI (à 80%). Les figures ont été produites par RI (à 90%) et SL et j'ai participé activement à l'écriture du manuscrit.

Préambule

Élucidation du rôle de Cuf2 lors du cycle méiotique et de la sporulation chez *S. pombe*.

Résumé de l'article :

Le cycle méiotique est un mode de division cellulaire spécialisé par lequel des cellules diploïdes produisent les gamètes haploïdes nécessaires à la reproduction sexuée. La progression du cycle méiotique requiert que plusieurs gènes soient exprimés au bon niveau et à la bonne étape du cycle. Au cours du cycle méiotique chez la levure *Schizosaccharomyces pombe*, quatre vagues successives d'expression génique sont à tour de rôle induites et réprimées par des facteurs de transcription méiose-spécifiques clés. Nos

résultats dévoilent que la protéine Cuf2, qui présente une homologie de séquence à différents facteurs de transcription sensibles à l'ion de cuivre, est exclusivement exprimée lors des divisions méiotiques. Nos résultats indiquent que l'expression du gène *cuf2*⁺, ainsi que celui de la protéine, n'est pas régulée par le statut de l'ion de cuivre. Au contraire, l'induction de *cuf2*⁺ requiert la présence de Mei4, un facteur de transcription méiose-spécifique clé qui active l'expression de la majorité des gènes méiotiques lors des divisions nucléaires. Des analyses microscopiques de cellules méiotiques exprimant une protéine de fusion Cuf2-GFP ont révélé que Cuf2 se co-localise avec le matériel génétique en ségrégation au cours des deux divisions méiotiques. En absence de Cuf2, l'expression d'une multitude de gènes méiotiques demeure anormalement élevée suite aux divisions méiotiques. Notamment, dans un mutant *cuf2*Δ/Δ, les membranes de spores présentent une morphologie anormale et plus de la moitié des ascospores qui en découlent sont inviables. Collectivement, nos résultats révèlent que Cuf2 participe à la régulation de l'expression d'une multitude de gènes méiotiques et que cette fonction est critique à la sporulation chez la levure *S. pombe*.

Cuf2 is a novel meiosis-specific regulatory factor of meiosis maturation.

Raphael Ioannoni¹, Jude Beaudoin¹, Luis Lopez-Maury², Sandra Codlin², Jurg Bahler², and Simon Labbe^{1*}.

From Département de Biochimie¹, Faculté de médecine et des sciences de la santé, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, QC, J1E 4K8, Canada, ²Department of Genetics, Evolution and Environment, University College London, London, WC1E 6BT, UK.

*Address correspondence to: Simon Labbe, Faculté de médecine Z-8, 3201, Jean Mignault, Sherbrooke (QC) J1E 4K8 Canada. Tel: (819) 821-8000 ext.: 75460;

E-mail: Simon.Labbe@USherbrooke.ca

Keywords: Meiosis, fission yeast, meiotic transcriptional program, copper-fist-type regulator, sporulation.

Abstract

Background. Meiosis is the specialized form of the cell cycle by which diploid cells produce the haploid gametes required for sexual reproduction. Initiation and progression through meiosis requires that the expression of the meiotic genes is precisely controlled so as to provide the correct gene products at the correct times. During meiosis, four temporal gene clusters are either induced or repressed by a cascade of transcription factors.

Principal Findings. In this report a novel copper-fist-type regulator, Cuf2, is shown to be expressed exclusively during meiosis. The expression profile of the *cuf2*⁺ mRNA revealed that it was induced during middle-phase meiosis. Both *cuf2*⁺ mRNA and protein levels are unregulated by copper addition or starvation. The transcription of *cuf2*⁺ required the presence of a functional *mei4*⁺ gene encoding a key transcription factor that activates the expression of numerous middle meiotic genes. Microscopic analyses of cells expressing a functional Cuf2-GFP protein revealed that Cuf2 co-localized with both homologous chromosomes and sister chromatids during the meiotic divisions. Cells lacking Cuf2 showed an elevated and sustained expression of several of the middle meiotic genes that persisted even during late meiosis. Moreover, cells carrying disrupted *cuf2*Δ/*cuf2*Δ alleles displayed an abnormal morphology of the forespore membranes and a dramatic reduction of spore viability. **Significance.** Collectively, the results revealed that Cuf2 functions in the timely repression of the middle-phase genes during meiotic differentiation.

Introduction

Meiosis is a specialized type of cell division by which sexually reproducing diploid organisms generate haploid gametes [1]. Gametogenesis starts with the pre-meiotic S-phase during which the DNA is replicated, thereby generating pairs of homologous chromosomes. Subsequently, these homologous chromosomes are subjected to genetic recombination, a process which is known to contribute to phenotypic diversity within a given population [2]. Homologous chromosomes and sister chromatids are then successively segregated, generating four haploid sets of chromosomes that are inheritable to the next generation. In the terminal stage of meiosis, a differentiation program is induced in order to generate four mature gametes ready for fertilization. Whereas these meiotic hallmarks have been extensively characterized, the molecular mechanisms that control meiotic progression and gamete maturation in higher eukaryotes remain less well understood.

Haploid gametes are present in very small numbers in most mammals, making molecular studies that require substantial amounts of material very arduous [3]. An additional difficulty comes from the fact that both animal models and tissue co-culture cells are not easy to synchronize with respect to their entry into meiosis [4,5]. Consequently, the use of model organisms has turned out to be a practical solution for the study of the molecular mechanisms that initiate and control meiosis [6,7]. Among these models, the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* has become particularly attractive for the study of the key molecular aspects of meiosis, from its initiation through to the generation of mature haploid cells [8]. *S. pombe* cells essentially undergo meiosis in a manner analogous to that of the germ line cells in higher eukaryotes, except that the gametes differentiate into spores that are enclosed in an ascus. Each ascus contains four haploid spores that are highly resistant to adverse environmental conditions [9].

Nitrogen availability triggers the decision to follow either the mitotic or the meiotic pathway in *S. pombe*. Under nitrogen-rich conditions, cells grow mitotically because the Pat1 kinase inhibits the initiation of meiosis by phosphorylating both the transcription factor Ste11 and the meiotic inducer Mei2 [10]. Conversely, under nitrogen-starved

conditions, the Ste11 transcription factor becomes active and induces the expression of the mating type loci [11]. As a consequence, haploid cells of the opposite mating types conjugate, forming diploid zygotes. A cascade of transcription factors then enables the expression of *mei3*⁺, which encodes for an inhibitor of the Pat1 kinase [12]. Once, Mei3 inhibits Pat1, the latter becomes unable to phosphorylate its target proteins, including Ste11 and Mei2. As an active Ste11 fosters *mei2*⁺ expression, unphosphorylated Mei2 accumulates and triggers the initiation of zygotic meiosis [10]. Zygotes can be returned to a nitrogen-rich medium before commitment to meiosis and will resume vegetative growth, forming colonies of diploid cells. Conveniently, these cells will undergo azygotic meiosis in response to a nitrogen starvation shock in a more synchronous manner than zygotic meiosis [13]. The *pat1-114* allele encodes a thermosensitive version of the Pat1 kinase. Consequently, cells harboring the *pat1-114* mutation show temperature-sensitive growth and undergo meiosis and sporulation at the restrictive temperature (34°C), thus bypassing the Mei3-dependent inactivation pathway of Pat1. The advantage of *pat1*-induced meiosis is that it is more synchronous than azygotic meiosis [13].

In fission yeast, meiosis progression is driven by an extensive gene expression program during which the expression of several genes is either induced or repressed [14]. Transcriptional profiles have defined four successive waves of gene expression that are mainly controlled by key meiosis-specific regulators [15]. First, nitrogen starvation triggers the activation of Ste11, which in turn activates the expression of the nutrient-responsive genes so as to initiate meiosis [11]. The expression of the nutrient-responsive genes is subsequently repressed by the transcription factor Rep1, which in turn activates the expression of several early meiotic genes [15]. Once chromosome pairing and homologous recombination have been completed, the transcription factor Mei4 activates the expression of the middle meiotic genes and represses that of the early genes [16,17]. Rep1 and Mei4 function in both the activation and the repression of gene expression. Although the transcription factors Atf21, Atf31 and Rsv2 activate the expression of the late meiotic genes after the meiotic divisions, it is still unclear how the middle genes are repressed at the end of the middle meiotic phase, a step that precedes late meiosis [15].

When the previously identified potential meiotic transcriptional regulators were examined, one, denoted Cuf2 (*SPCC584.02*) was found to be a putative copper-fist-like transcription factor whose expression profile exhibited a peak that coincided with both the meiotic divisions and the forespore membrane formation [14]. Based on sequence homologies with other metalloregulatory transcription factors, it is predicted that the amino-terminal residues 1 to 40 of Cuf2 contains a Zn^{2+} module that is required for DNA minor groove binding [18]. The Cuf2 protein exhibits 42% sequence identity with the N-terminal 61 amino acid residues of the copper-fist-like transcription factor Cuf1 [19,20]. In *S. pombe*, Cuf1 activates transcription of genes that encode for Ctr copper transporters (Ctr4, Ctr5 and Ctr6) that are involved in copper acquisition [19,21-23, 36, 54]. Structurally, the similarity between the Cuf1 and Cuf2 proteins resides exclusively within the amino-terminal 61-residue segment of the two proteins. As is suggested for Cuf1-related transcription factors, residues 41 – 60 of Cuf2 that display high similarity with the residues 41 – 61 of Cuf1 may be required in order to allow the transcription factor to make contact with the major groove of DNA [19,24].

To gain further insight into the role of Cuf2, its expression profile was characterized. It was discovered that Cuf2 was strictly expressed during meiosis. The expression of *cuf2*⁺ required the presence of a functional *mei4*⁺ gene, which encodes a key regulator of several middle-phase meiotic genes. Microscopic analyses revealed that a functional Cuf2-GFP protein co-localized with the chromosomes that underwent late anaphase I, metaphase II, anaphase II (early and late) and forespore membrane (FSM) formation. Furthermore, *pan-S. pombe* microarray analysis revealed that 247 genes were up-regulated in a *cuf2Δ/cuf2Δ* disruption strain. In the absence of Cuf2, forespore membrane formation was abnormal and spore viability was significantly reduced. Taken together, the results of these studies revealed that Cuf2 is a meiosis-specific transcriptional regulator that is required for the down-regulation of a large set of middle-phase meiotic genes during meiotic development.

Material and methods

Yeast strains and media. The *S. pombe* strains used in this study are listed in Table 1. Standard methods were used for the growth, mating and sporulation of fission yeast cells [44]. Untransformed strains were maintained on yeast extract plus supplements (YES) containing 225 mg/L of adenine, histidine, leucine, uracil and lysine. The strains for which plasmid integration was required were grown on synthetic Edinburgh minimal medium (EMM) lacking the specific nutrients required for selection and maintenance of the recombinant plasmid. The h^+/h^- diploid strains used for azygotic meiosis were isolated as follows. Haploid cells of the opposite mating types were fused on a solid malt extract (ME) medium and the resulting zygotes were then returned to rich media (YES) prior to commitment to meiosis. At this point, the zygotes can resume vegetative growth as diploid cells and later on undergo azygotic meiosis upon a nitrogen (N)-starvation shock. Azygotic meiosis was induced using EMM lacking nitrogen (EMM-N) and supplemented with 10 mg/L of the required auxotrophic nutrients. Diploid strains homozygous for the mating type (h^+/h^+) were generated by protoplast fusion as described previously [45].

Table 1. *S. pombe* strains used in this study.

Strain	Genotype	Source
FY435	h^+ his7-366 leu1-32 ura4- Δ 18 ade6-M210	[48]
FY436	h^- his7-366 leu1-32 ura4- Δ 18 ade6-M216	[48]
FBY13	h^+ his3-D1 leu1-32 ura4- Δ 18 ade6-M210	This study
FBY14	h^- his3-D1 leu1-32 ura4- Δ 18 ade6-M216	This study
RAY1	h^+ his7-366 leu1-32 ura4- Δ 18 ade6-M210 <i>cuf2</i> Δ ::KAN ^r	This study
RAY2	h^- his7-366 leu1-32 ura4- Δ 18 ade6-M216 <i>cuf2</i> Δ ::KAN ^r	This study
RAY3	h^+ his3-D1 leu1-32 ura4- Δ 18 ade6-M210 <i>cuf2</i> Δ ::KAN ^r	This study
RAY4	h^- his3-D1 leu1-32 ura4- Δ 18 ade6-M216 <i>cuf2</i> Δ ::KAN ^r	This study
RAY5	h^+ his7-366 leu1-32 ura4- Δ 18 ade6-M210 <i>cuf2</i> Δ ::KAN ^r <i>cuf2</i> ⁺ -GFP	This study
RAY6	h^- his7-366 leu1-32 ura4- Δ 18 ade6-M216 <i>cuf2</i> Δ ::KAN ^r <i>cuf2</i> ⁺ -GFP	This study
RAY7	h^+/h^- his7-366/his7-366 leu1-32/leu1-32 ura4- Δ 18/ura4- Δ 18 ade6-M210/ade6-M216	This study
RAY8	h^+/h^- his3-D1/his3-D1 leu1-32/leu1-32 ura4- Δ 18/ura4- Δ 18 ade6-M210/ade6-M216	This study
RAY9	h^+/h^- his7-366/his7-366 leu1-32/leu1-33 ura4- Δ 18/ura4- Δ 18 ade6-M210/ade6-M216 <i>cuf2</i> Δ ::KAN ^r / <i>cuf2</i> Δ ::KAN ^r	This study
RAY10	h^+/h^- his3-D1/his3-D1 leu1-32/leu1-33 ura4- Δ 18/ura4- Δ 18 ade6-M210/ade6-M216 <i>cuf2</i> Δ ::KAN ^r / <i>cuf2</i> Δ ::KAN ^r	This study
RAY11	h^+/h^- his7-366/his7-366 leu1-32/leu1-33 ura4- Δ 18/ura4- Δ 18 ade6-M210/ade6-M216 <i>cuf2</i> Δ ::KAN ^r / <i>cuf2</i> Δ ::KAN ^r <i>cuf2</i> ⁺ -GFP/ <i>cuf2</i> ⁺ -GFP	This study
JB484	h^+ pat1-114 ade6-M210	[11]
JB485	h^+ pat1-114 ade6-M216	[11]
RAY12	h^+ pat1-114 ade6-M210 <i>cuf2</i> Δ ::KAN ^r	This study
RAY13	h^+ pat1-114 ade6-M216 <i>cuf2</i> Δ ::KAN ^r	This study
RAY14	h^+ pat1-114 ade6-M210 <i>mei4</i> Δ ::KAN ^r	This study
RAY15	h^+ pat1-114 ade6-M216 <i>mei4</i> Δ ::KAN ^r	This study
RAY16	h^+ pat1-114 ade6-M210 <i>cuf2</i> Δ ::KAN ^r <i>cuf2</i> ⁺	This study
RAY17	h^+ pat1-114 ade6-M210 <i>cuf2</i> Δ ::KAN ^r <i>cuf2</i> ⁺ -TAP	This study
RAY18	h^+/h^+ pat1-114/pat1-114 ade6-M210/ade6-M216	This study
RAY19	h^+/h^+ pat1-114/pat1-114 ade6-M210/ade6-M216 <i>cuf2</i> Δ ::KAN ^r / <i>cuf2</i> Δ ::KAN ^r	This study

RAY20	$h^+/h^+ pat1-114/pat1-114 ade6-M210/ade6-M216 mei4\Delta::KAN^r/mei4\Delta::KAN^r$	This study
RAY21	$h^+/h^+ pat1-114/pat1-114 ade6-M210/ade6-M216 cuf2\Delta::KAN^r/cuf2\Delta::KAN^r$ $cuf2^+/cuf2^+$	This study
RAY22	$h^+/h^+ pat1-114/pat1-114 ade6-M210/ade6-M216 cuf2\Delta::KAN^r/cuf2\Delta::KAN^r$ $cuf2^+-TAP/cuf2^+-TAP$	This study
RAY23	$h^+ pat1-114 ade6-M210 meu5\Delta::KAN^r$	This study
RAY24	$h^+ pat1-114 ade6-M216 meu5\Delta::KAN^r$	This study
RAY25	$h^+/h^+ pat1-114/pat1-114 ade6-M210/ade6-M216 meu5\Delta::KAN^r/meu5\Delta::KAN^r$	This study
RAY26	$h^+ pat1-114 ade6-M210 cuf2\Delta::loxP meu5\Delta::KAN^r$	This study
RAY27	$h^+ pat1-114 ade6-M216 cuf2\Delta::loxP meu5\Delta::KAN^r$	This study
RAY28	$h^+/h^+ pat1-114/pat1-114 ade6-M210/ade6-M216 cuf2\Delta::loxP/cuf2\Delta::loxP$ $meu5\Delta::KAN^r/meu5\Delta::KAN^r$	This study

pat1-induced meiosis. In order to synchronize *pat1-114/pat1-114* diploid cells for their entry into the meiotic program, the cells were pre-cultured in EMM supplemented with adenine (225 mg/L) at 25°C. The cells were harvested at mid-log phase (1×10^7 cells/mL) and washed twice before being transferred to EMM-N supplemented with 10 mg/L of adenine. After incubating for 16 h at 25°C, 0.5 mg/mL of NH_4Cl was added to the culture medium and the culture divided into three. The three fractions were either left untreated, or were treated with either 50 μM of ammonium tetrathiomolybdate (TTM) (323446; Sigma-Aldrich) or $CuSO_4$ concentrations that ranged from 25 to 100 μM . At this point, the temperature was shifted to 34°C so as to induce meiosis. Meiosis progression was monitored by adding Hoechst 33342 stain to 5 $\mu g/mL$ (Invitrogen) at different times following meiotic induction.

Plasmids. As shown in the Results section, the *cuf2⁺* gene was found to be exclusively expressed during meiosis. Furthermore, as reported by others [46], it was determined that the gene contained two introns located within its 5'-end's coding region (data not shown). Because of these features, a synthetic DNA fragment possessing the first 52 codons of *cuf2⁺* that was optimized for translation in both *S. pombe* and *E. coli* was fused in-frame to the genomic *cuf2⁺* codons 53 through 177. To generate the synthetic intron-less DNA segment of *cuf2⁺* (i. e. codons 1-52), four oligonucleotides that were partially complementary to each other were annealed in a pairwise manner, forming a partially double-stranded DNA molecule. This molecule was then made completely double-stranded by incubating it with the Klenow fragment of DNA polymerase I in the presence of the four dNTPs. The resulting synthetic DNA fragment was digested with PstI and AflII, as these restriction sites had previously been inserted on either side of the desired fragment, and the

fragment was then purified using a EZ-10 spin column (Bio Basic, Markham, ON). PCR amplification of the 3'-end DNA segment of *cuf2*⁺ (i. e. codons 53-177, excluding the stop codon) was carried out using primers designed to generate AflII and SmaI restriction sites at the upstream and downstream termini of the segment, respectively. Genomic DNA from the FY435 *S. pombe* wild-type strain was used as DNA template in this step as no introns have been mapped within this region. The PstI-AflII synthetic intron-less DNA fragment (codons 1-52) and the AflII-SmaI PCR-amplified DNA fragment (codons 53-177) were then ligated together in the PstI-SmaI sites of the pBluescript SK vector (Stratagene, La Jolla, CA), creating pSK*cuf2*⁺. To create a plasmid possessing the *cuf2*⁺ gene in-frame with the TAP tag, the coding sequence of TAP was PCR amplified from pJK-148*TAP-fep1*⁺ [47]. The resulting DNA fragment was digested with SmaI and SacI, and then fused in-frame with *cuf2*⁺ into the corresponding sites of pSK*cuf2*⁺, generating pSK*cuf2*⁺-*TAP*. To generate the pSK*cuf2*⁺-*GFP* plasmid, a SmaI-SacI PCR-amplified DNA segment containing the GFP coding sequence was isolated from the plasmid pBP*ctr4*⁺-*GFP* [22], and was then substituted for the SmaI-SacI restriction fragment present in the plasmid pSK*cuf2*⁺-*TAP*, thereby replacing the TAP epitope with the GFP fluorescent fragment. Subsequently, the *cuf2*⁺ promoter, up to position -500 from the start codon of the *cuf2*⁺ gene, was isolated by PCR using *S. pombe* FY435 genomic DNA as template [48]. Once purified, the DNA fragment was digested with ApaI and PstI and inserted immediately upstream of both the *cuf2*⁺-*TAP* and *cuf2*⁺-*GFP* fusion alleles, generating pSK-500*cuf2*⁺-*TAP* and pSK-500*cuf2*⁺-*GFP*, respectively. The resulting plasmids were subsequently digested with ApaI and SacI, and the DNA fragments containing the coding sequences of the *cuf2*⁺-*TAP* and *cuf2*⁺-*GFP* genes (both under the control of the *cuf2*⁺ promoter) then inserted into the corresponding sites of both pBP*ade6*⁺ and pJK148 [22,49]. The integrative plasmids were denoted pBP-500*cuf2*⁺-*TAP*, pBP-500*cuf2*⁺-*GFP*, pJK-500*cuf2*⁺-*TAP* and pJK-500*cuf2*⁺-*GFP*. To monitor the formation of the forespore membrane (FSM) in meiotic cells, an expression plasmid harboring the *GFP-psy1*⁺ fusion allele was constructed as described previously [37].

Table 2. Riboprobes used to detect steady-state levels of transcripts.

Gene ID	Gene name	Riboprobe	Position relative to	Source or reference
---------	-----------	-----------	----------------------	---------------------

		length (bp)	initiator codon	
<i>SPAC584.02</i>	<i>cuf2</i> ⁺	208	+173 to 380	This study
<i>SPBC32H8.11</i>	<i>mei4</i> ⁺	200	+171 to +370	This study
<i>SPAC1610.03c</i>	<i>meu5</i> ⁺	200	+501 to +700	This study
<i>SPBC1347.03</i>	<i>meu14</i> ⁺	210	+351 to +560	This study
<i>SPAC1B2.03c</i> ⁺	-	202	+565 to +766	This study
<i>SPCC162.04c</i>	<i>wtf13</i> ⁺	198	+1222 to +1419	This study
<i>SPBC1348.01</i> ⁺	-	195	+241 to +435	This study
<i>SPBC32H8.12c</i>	<i>act1</i> ⁺	151	+334 to +485	[51]

RNA isolation and analysis. Total RNA was extracted using a hot phenol method as described previously [50] and was quantified spectrophotometrically. In the case of the RNase protection assays, 15 µg of RNA per reaction were used as described previously [51]. DNA templates for the antisense riboprobes (Table 2) were cloned into the BamHI and EcoRI sites of the pBluescript SK vector. The resultant constructs were linearized with BamHI for subsequent antisense RNA labelling with [α -³²P]UTP and T7 RNA polymerase as described previously [51]. *act1*⁺ mRNA was probed as an internal control for normalization during quantification of the RNase protection products.

Experimental design and microarray experiments. An experimental design based on the following node, *h*⁺/*h*⁺ *pat1-114/pat1-114* (*cuf2*⁺/*cuf2*⁺) versus *h*⁺/*h*⁺ *pat1-114/pat1-114* *cuf2* Δ /*cuf2* Δ was adopted. The meiotic time courses were performed in triplicate. Two of the trials were used in the microarray protocol in which the Cy dyes were swapped. The third trial was used for the analysis of the mRNAs using the RNase protection protocol. After 9 h of meiotic induction under basal conditions, cells corresponding to 5 optical density units ($\sim 1 \times 10^8$ cells/mL) were harvested by centrifugation and snap-frozen by immersion in liquid nitrogen. Total RNA was extracted using a hot phenol method [50]. RNA (20 µg) was labelled by directly incorporating Cy3- and Cy5-dCTP using Superscript (Invitrogen, Carlsbad, CA) reverse transcriptase as described previously [52]. The resulting cDNA preparation was hybridized onto glass DNA microarrays containing probes for 99.3% of all known and predicted *S. pombe* genes. The microarrays were scanned using a GenePix 4000B laser scanner (Axon instruments, Foster City, CA). Data were subsequently analyzed using the GenePix pro software. Unreliable signals were filtered out, and the data were normalized using a customized Perl script [52]. This script applies cut-

off criteria to discard the data from weak signals. Genes that did not yield reproducible results between trials were discarded. Similarly, genes for which 50% of the data points were missing were also discarded. Data acquisition, processing and normalization were performed using the GeneSpring GX software (Agilent Technologies, Cheshire, UK). Normalized signals were exported from GeneSpring into Microsoft Excel spreadsheets and the expression ratios of biological repeat experiments were averaged. A gene was classified as *cuf2*⁺-dependent if its expression was up- or down-regulated ≥ 1.5 -fold in the *cuf2* Δ /*cuf2* Δ strain, as compared to the wild-type strain grown under basal conditions. Gene annotations were retrieved from GeneDB at the Sanger Institute WEB site <http://www.genedb.org/genedb/pombe/index.jsp>.

Protein extraction and Western blot analysis. Whole cell extracts were prepared using a trichloroacetic acid extraction method [53], and equal amounts of each sample were subjected to electrophoresis on 10% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels. After electrophoresis, the proteins were electroblotted onto nitrocellulose Hybond-ECL membranes (GE Healthcare, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK). The immunoblots were analyzed for the steady-state levels of Cuf2-TAP and the α -tubulin protein using both polyclonal anti-mouse IgG antibody (ICN Biomedicals, Aurora, OH) and monoclonal anti- α -tubulin antibody B-5-1-2 (Sigma-Aldrich Canada, Oakville, ON). After a 1-h incubation with the above-mentioned primary antibodies in 1% powdered skimmed milk in PBST (10.1 mM Na₂HPO₄, 1.8 mM KH₂PO₄, pH 7.4, 138 mM NaCl, 2.7 mM KCl and 0.1% Tween 20), the membranes were washed three times with PBST, incubated with the appropriate horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies (GE Healthcare, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK) and visualized by chemiluminescence detection on X-ray films.

Microscopic analysis of Cuf2-GFP localization. *h*⁺ *cuf2* Δ and *h*⁻ *cuf2* Δ haploid cells expressing the *cuf2*⁺-GFP allele were grown under low nitrogen (N) conditions and were then crossed in order to produce diploid zygotes. After mating, the cells were quickly transferred to rich YES medium so as to stabilize their diploid state. The azygotic meiosis of diploid cells was synchronously induced by transferring the cells to nitrogen-poor EMM

as described previously [37]. At the zero time point when cells had just entered meiosis, they were maintained in nitrogen-poor EMM supplemented with 10 mg/L of adenine, histidine, leucine, uracil and lysine. Culture aliquots were taken up every hour and 5 μ g/mL of Hoechst 33342 was added to analyze the progression of meiosis at a single-cell scale. At the indicated meiotic phase, the cells were subjected to microscopic analysis using a 1,000X magnification with the following filters: 465 to 495 nm (GFP) and 340 to 380 nm (Hoechst 33342). Both fluorescence and differential interference contrast images (Nomarski) of the cells were obtained using a Nikon Eclipse E800 epifluorescent microscope (Nikon, Melville, NY) equipped with a Hamamatsu ORCA-ER digital cooled camera (Hamamatsu, Bridgewater, NJ). The cell fields shown in this study represent a minimum of five independent experiments. The merged images were obtained using the Simple PCI software version 5.3.0.1102 (Compix, Sewickly, PA).

Spore viability. h^+ wild-type cells and h^+ cells harboring a *cuf2* Δ deletion with either an empty integrative vector or a *cuf2* $^+$ -GFP allele were mated with their corresponding isogenic h^- cells (h^- wild-type, h^- *cuf2* Δ and h^- *cuf2* Δ +*cuf2* $^+$ -GFP, respectively) onto ME-agar plates. When asci were observed, the ascospores were transferred from ME to YES-agar plates and incubated for 4 h at 36°C so as to accelerate ascus breakdown. More than 200 spores from each of the three strains (*cuf2* $^+$ /*cuf2* $^+$, *cuf2* Δ /*cuf2* Δ and *cuf2* Δ /*cuf2* Δ *cuf2* $^+$ -GFP/*cuf2* $^+$ -GFP) were dissected and sequentially separated approximately 10 mm apart with the aid of a micromanipulator (MS series 200; Singer Instrument, UK). Following spore dissection, the isolated spores were examined to determine whether or not they retain viability on YES-agar plates. Spore viability was expressed as a percentage of the total number of spores dissected. Spore viability counts reported in this study represent a minimum of four independent experiments.

Results

S. pombe Cuf2 protein. Analysis of genomic DNA sequences from the *S. pombe* Genome Project revealed an open reading frame (SPCC584.02) that encoded an uncharacterized protein which displayed an extended homology at its N terminus to the N terminus of the *S. pombe* copper-sensing transcription factor Cuf1. Because this common region was shared by the two proteins, the locus SPCC584.02 was named *cuf2*⁺. The N-terminal 60 amino acid segment of Cuf2 displayed 42% sequence identity and 62% sequence similarity with the Cuf1 61 amino acid segment (Fig. 1). A putative zinc coordination domain (residues 1-40) lies within this region of Cuf2 and may be part of a minor groove DNA binding domain that is similar to those found in previously characterized copper metalloregulatory transcription factors [25]. Such regulators are mainly involved in either the copper detoxification or copper acquisition pathways. In particular, the Ace1 and Amt1 proteins from the yeasts *S. cerevisiae* and *C. glabrata*, respectively, promote copper detoxification via the induction of metallothionein gene transcription and possess such a domain [26]. In the yeasts *S. cerevisiae* and *S. pombe*, the Mac1 and Cuf1 proteins, respectively, promote copper acquisition through the induction of the copper transporting genes [20,27]. Similar to Ace1, Amt1, Mac1 and Cuf1, Cuf2 harbors a conserved (R/K)GRP motif (Fig. 1) that is known to be involved in the direct binding of the nucleotides located within the minor groove of DNA helix [18,24]. Interestingly, the N-terminal region of Cuf2, specifically residues 11 to 53, contained 9 basic amino acids (Arg¹⁶, Arg¹⁹, Arg²⁸, Arg³⁴, Arg³⁶, Arg³⁸, Lys⁴⁴, Arg⁴⁶ and Lys⁴⁹) that are highly conserved in Cuf1 and whose presence (underlined amino acids) has been shown to be required for the targeting of Cuf1 to the nucleus [28]. The first N-terminal 60 amino acid residues of Cuf2 also shared a strong sequence homology with the N terminal sequences of the Ace1 and Amt1 proteins. However, Cuf2, as is the case of Cuf1, did not possess the second half of the Ace1/Amt1 copper regulatory domain in which two highly conserved Cys-X-Cys sequence motifs are found [20]. The absence of these two Cys pairs in Cuf2 makes improbable the formation of Ace1/Amt1-like copper regulatory domain that consists of two lobes separated by a cleft in which a Cu₄S₆ center takes place in the presence of copper ions [18]. Moreover, as opposed to Cuf1 and Mac1, Cuf2 did not contain a Cys-rich domain (Cys-X-Cys-X_(3/4)-Cys-X-Cys-X₂-Cys-X₂-His) located near its C terminus that could sense and coordinate copper ions [29-31]. In

fact, the C-terminal region of Cuf2 lacked any potential motif that could bind copper ions. Nevertheless, because some features of Cuf2 were reminiscent of copper-regulatory transcription factors, the *cuf2*⁺ gene was isolated for further analysis.

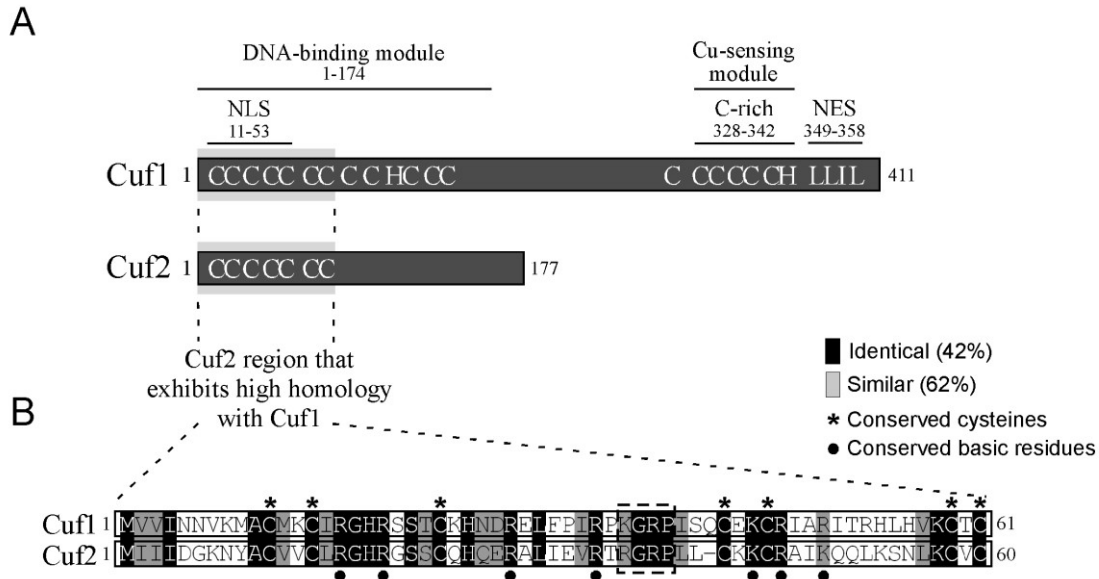


Fig. 1. Comparison of Cuf2 with the *S. pombe* copper metalloregulatory transcription factor Cuf1. *A*, Schematic representations of Cuf1 and Cuf2. The amino acid sequences of both proteins are numbered relative to their initiator codons. The locations of the domains required for Cuf1 function are indicated, including the N-terminal NLS (11-53) that is located within the DNA-binding module (1-174), the C-terminal Cu-sensing module (C-rich) (328-342) and the C-terminal NES (349-358). The positions of some of the Cys (C) and His (H) residues within both Cuf1 and Cuf2 are also indicated. *B*, Amino acid alignment of the N-terminal 61 amino acid residues of Cuf1 with the N-terminal 60-residue segment of Cuf2. The black boxes indicate identical amino acids, and the gray boxes indicate amino acids that are similar between Cuf2 and Cuf1. The asterisks highlight the 7 Cys residues that are conserved between Cuf2 and Cuf1. The indicated N-terminal 1-60 amino acid region of Cuf2 exhibits 42% sequence identity and 62% sequence similarity with the N-terminal 61 amino acids of Cuf1 that are part of its DNA-binding domain.

cuf2⁺ is expressed exclusively during meiosis. Initial experiments using cells proliferating in mitosis failed to detect the *cuf2*⁺ transcript regardless of the copper status (Fig. 2A). In contrast, as expected, the *ctr4*⁺ copper transport mRNA levels (assayed as a control) were up- (~10-fold) and down- (~3-fold) regulated after treatment with the copper chelator TTM and copper, respectively, as compared to basal conditions (Fig. 2A). The *cuf2*⁺ transcript was first detected in genome-wide studies in which cells were switched from mitosis to

meiosis [14]. After cell entrance into meiosis, the expression profile of *cuf2*⁺ revealed that it reached a maximum 5 h after meiotic induction, indicating that *cuf2*⁺ was a middle meiotic gene potentially involved in the differentiation process [14].

S. pombe cells growing mitotically carry an active Pat1 kinase which inhibits cells from entering meiosis. Cells harboring the *pat1-114* mutation show a temperature-sensitive growth and undergo meiosis at the restrictive temperature of 34°C. The use of the *pat1-114* temperature-sensitive mutant permits the synchronization of cells in terms of their entry into the meiotic program [12]. To further investigate the expression profile of *cuf2*⁺ during meiosis, a *pat1-114/pat1-114* diploid strain that was pre-synchronized in G1 mitotic-phase by nitrogen starvation at 25°C was used. The temperature was then shifted to 34°C so as to inactivate Pat1 and allow the cells to undergo synchronous meiosis. The results obtained were consistent with data reported by others [14], namely that the expression of *cuf2*⁺ peaked between 4 and 6 h after meiotic induction (Fig. 2B). A homozygous *pat1-114/pat1-114 cuf2Δ/cuf2Δ* diploid strain was generated to validate the signal corresponding to the *cuf2*⁺ RNase protection product (data not shown). In all of the experiments the *cuf2*⁺ transcript was found to be absent in the disruption strain (*cuf2Δ/cuf2Δ*), irrespective of the copper status (data not shown). To examine if copper availability had any effect on the expression of *cuf2*⁺ during the meiotic program, the cells were either left untreated or were treated with either the copper chelator TTM (50 μM) or CuSO₄ (50 μM) prior to the temperature shift (34°C). Aliquots of cultures were taken every 2 h following meiotic induction, and the steady-state levels of *cuf2*⁺ mRNA were analyzed by RNase protection assays. Results showed that the steady-state levels of *cuf2*⁺ mRNA under basal (untreated), copper-starved (50 μM TTM) or copper replete (50 μM CuSO₄) conditions were primarily increased between 4 and 6 h following meiotic induction (Fig. 2B). In response to 50 μM copper, the *cuf2*⁺ mRNA levels were induced within 4 h, but were down-regulated to a lesser degree over time and were maintained at a level ~1.4-fold above the basal mRNA levels detected in untreated cells (Fig. 2B). To ascertain whether or not the steady-state levels of Cuf2 protein followed those of the *cuf2*⁺ mRNA, a *pat1-114/pat1-114 cuf2Δ/cuf2Δ* strain in which a functional *cuf2*⁺-TAP fusion allele was returned into the genome by integration was used. The results showed that, under basal, low or high copper

conditions, Cuf2-TAP protein levels increased in a manner similar to that of the *cuf2*⁺ transcript levels, although it should be noted that steady-state levels of Cuf2 protein remained present for a longer period of time than did the mRNA (Fig. 2C). To ensure that cell growth conditions (basal, 50 μ M TTM or CuSO₄) had no negative effect on meiotic progression and sporulation, a series of microscopic analyses were performed. *pat1-114/pat1-114* diploid cells were synchronously induced into meiosis and Hoescht 33342 was added to 0.5 μ g/ μ l every hour to cell culture aliquots to visualize the DNA and monitor meiotic progression. Under basal and copper conditions, meiosis I occurred primarily between 3.5 and 6 h after meiotic induction, meiosis II between 6.5 and 8 h (Fig. 2D) and sporulation after 8 h (data not shown). Although meiotic progression of cells under mild copper starvation conditions (50 μ M TTM) was slowed by approximately 1 h as compared to untreated (basal) cells, spore formation was clearly observed at the end of meiosis (data not shown). Globally, cells that were grown under basal, low or elevated (50 μ M) copper concentrations displayed no significant changes in their ability to proceed meiosis since there was no apparent timing defect in their progression (Fig. 2D). Taken together, these results indicated that, under basal, copper-depleted and copper-replete conditions, the *cuf2*⁺ gene is effectively but transiently expressed during meiosis. Furthermore, the Cuf2 protein was mostly produced during meiotic divisions, with reduced levels of protein that persist towards the end of the meiotic program.

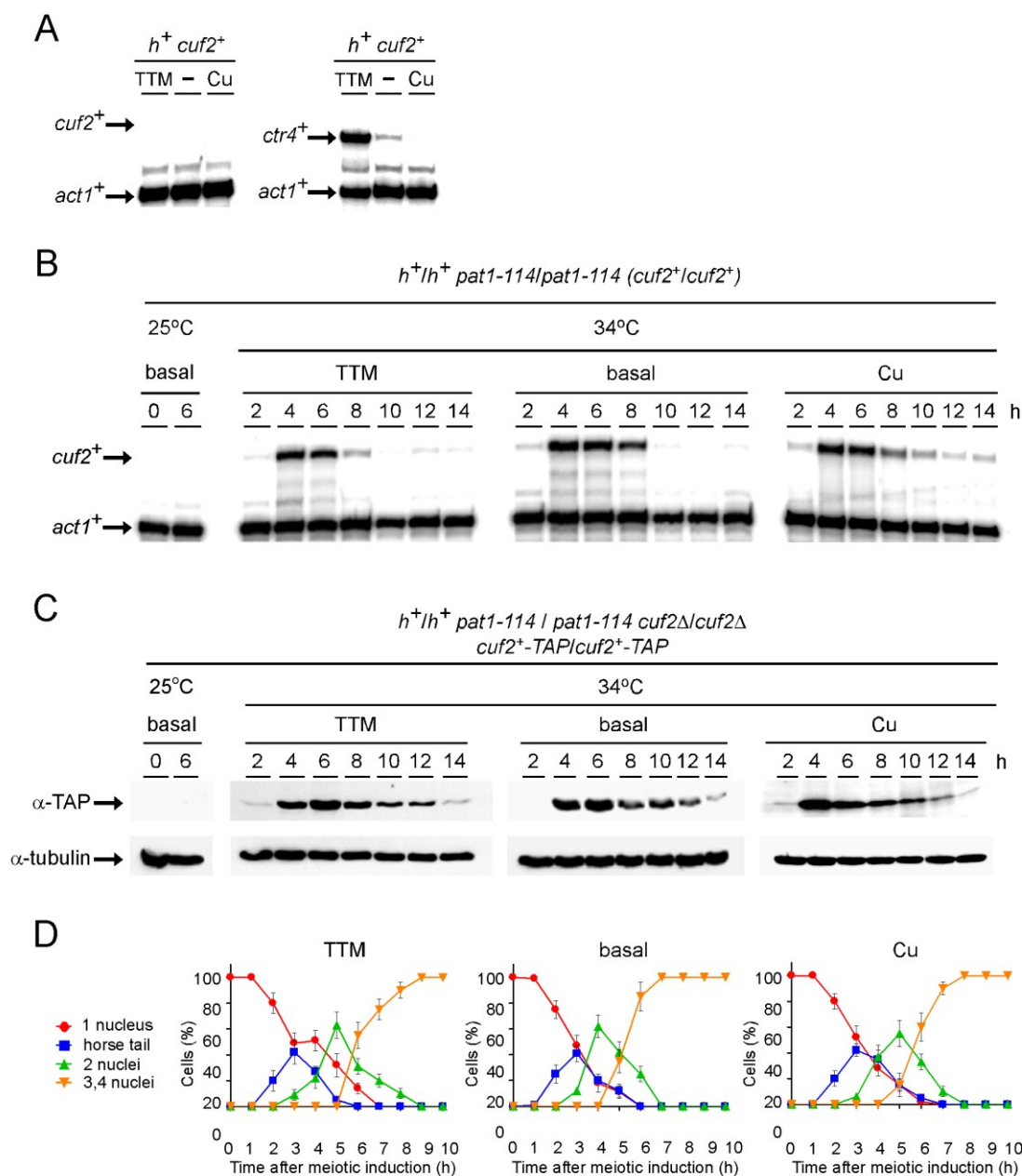


Fig. 2. Assessment of the mRNA and protein steady-state levels of *Cuf2* during meiosis. *A*, Representative expression profiles of the *cuf2⁺* and *ctr4⁺* mRNAs in *h⁺* haploid cells that were either left untreated (-) or were treated with either 50 μ M TTM or 50 μ M CuSO_4 during mitosis. *B*, Cultures of *pat1-114/pat1-114* diploid cells were either maintained in vegetative growth at 25°C, or were induced to initiate and proceed through meiosis at 34°C. *pat1-114/pat1-114* diploid cells were either left untreated, or incubated in the presence of 50 μ M TTM or 50 μ M CuSO_4 . Total RNA was isolated at the indicated time points after the induction of meiosis. Shown are representative RNase protection assays of both the *cuf2⁺* and the *act1⁺* (internal control) mRNA steady-state levels during meiosis. *C*, *Cuf2*-TAP protein expression during meiosis. *pat1-114/pat1-114 cuf2Δ/cuf2Δ* diploid cells expressing *Cuf2*-TAP were either left uninduced (25°C), or were induced (34°C) under

basal conditions or in the presence of 50 μ M TTM or 50 μ M CuSO₄. Shown are Western blots of both Cuf2-TAP and α -tubulin (control loading) levels at different time points after meiotic induction. *D*, Meiotic progression of cells under either basal (untreated) conditions, or in the presence of TTM (50 μ M) or CuSO₄ (50 μ M). The values shown for each condition (TTM, basal or Cu) correspond to the percentage of cells with 1, 2, or 3-4 nuclei, and the percentage of cells with horse tails. The graphed values represent the averages of triplicate determinations \pm the standard deviations.

The mei4⁺ gene is required for cuf2⁺ gene expression. Genome-wide studies of the global effects of the deletions of meiosis-specific transcription factors have revealed that the transcription regulator Mei4 is required for the induction of numerous of the middle meiosis-specific genes [15]. To independently assess whether or not Mei4 was necessary for the expression of the middle meiotic gene *cuf2⁺*, RNase protection assays in synchronous meiosis experiments were carried out using a *pat1-114/pat1-114 mei4 Δ /mei4 Δ* diploid strain and the results were compared to those obtained with a *pat1-114/pat1-114* control strain. In the case of *pat1-114/pat1-114* control cells, *cuf2⁺* exhibited a typical middle meiosis gene time-dependent expression profile, peaking 4 h after meiotic induction (Fig. 3). In contrast, *cuf2⁺* mRNA was absent in *pat1-114/pat1-114 mei4 Δ /mei4 Δ* cells throughout meiosis (Fig. 3). Furthermore, the *cuf2⁺* transcript was not detected in the *pat1-114/pat1-114 mei4 Δ /mei4 Δ* mutant under all of the conditions tested, including basal, copper-replete and copper-depleted conditions (data not shown). The observation that the *pat1-114/pat1-114 mei4 Δ /mei4 Δ* deletion strain showed a loss of *cuf2⁺* gene expression indicates that the meiotic-dependent expression of *cuf2⁺* mRNA requires Mei4.

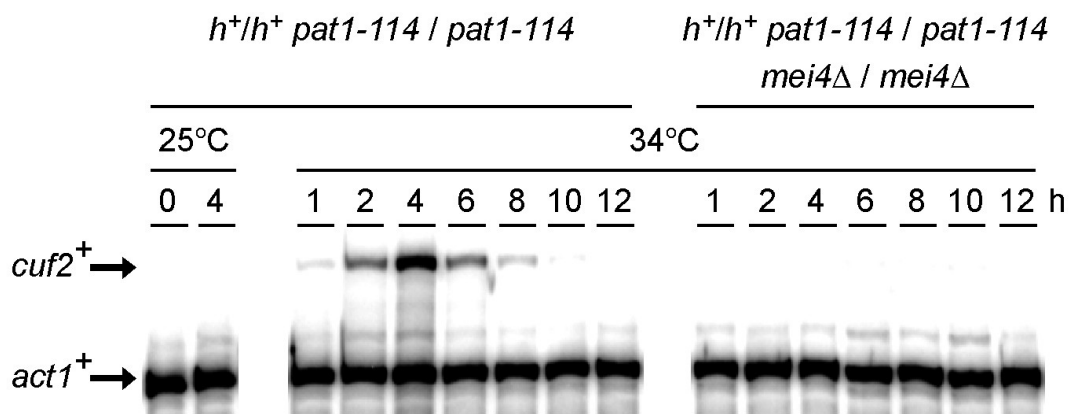


Fig. 3. *cuf2⁺* gene expression is Mei4-dependent. *pat1-114/pat1-114 (mei4⁺/mei4⁺)* and *pat1-114/pat1-114 mei4 Δ /mei4 Δ* strains were pre-synchronized by nitrogen starvation at 25°C, and then were induced to undergo synchronous meiosis at 34°C. At the indicated

time points, the *cuf2*⁺ and *act1*⁺ (internal control) mRNA levels were analyzed in both the control strain (*mei4*⁺/*mei4*⁺) and the isogenic strain lacking the *mei4*⁺ alleles. To validate the absence of the *cuf2*⁺ transcript during mitosis, total RNA was probed for the presence of *cuf2*⁺ mRNA in vegetative cells incubated at 25°C.

Subcellular localization of Cuf2 during meiosis. Based on the fact that Cuf2 was a meiosis-specific protein, the next step was the elucidation of its subcellular location during the meiotic program. Hence, a GFP coding sequence was fused in-frame with the 3'-end of the *cuf2*⁺ gene. When the Cuf2-GFP fusion protein was expressed in meiosis, it complemented the forespore membrane (FSM) formation deficiency and triggered the down-regulation of several middle meiotic genes in a manner similar to that of either the wild-type (untagged) or the TAP epitope-tagged Cuf2 (Fig. 7B and data not shown). In another series of experiments, a functional *cuf2*⁺-GFP allele was integrated into *h*⁻ *cuf2*Δ and *h*⁺ *cuf2*Δ cells. After mating, *h*⁻/*h*⁺ *cuf2*Δ/*cuf2*Δ *cuf2*⁺-GFP/*cuf2*⁺-GFP diploid cells were cultured so that they undergo azygotic synchronous meiosis. Following the induction of meiosis under basal conditions, the Cuf2-GFP fluorescent protein was first detected in late anaphase I / metaphase II, and co-localized with the homologous chromosomes that had undergone the first meiotic division (Fig. 4). At early anaphase II, meiotic cells displayed Cuf2-GFP fluorescence as two pairs of fluorescent spots that appeared to correspond with the chromosomal material (as marked by Hoechst-staining) that had undergone sister chromatid segregation. At late anaphase II, the Cuf2-GFP fusion protein generated a fluorescent signal that behaved like the chromosomal material, and its fluorescence was redistributed in a manner identical to that of the sister chromatids, generating four distinct fluorescent spots in the zygote (Fig. 4). At the end of anaphase II after sister chromatid segregation, the Cuf2-GFP fluorescent signal progressively decreased (during FSM formation) and finally disappeared after spore formation (Fig. 4). Collectively, microscopic analyses of meiotic cells revealed that a functional Cuf2-GFP localized with the chromosomes that had undergone anaphase I, metaphase II and anaphase II (both early and late). These observations were consistent with a regulatory role for Cuf2 at the DNA level, especially during the end of the first and second meiotic divisions and the early steps of forespore membrane formation.

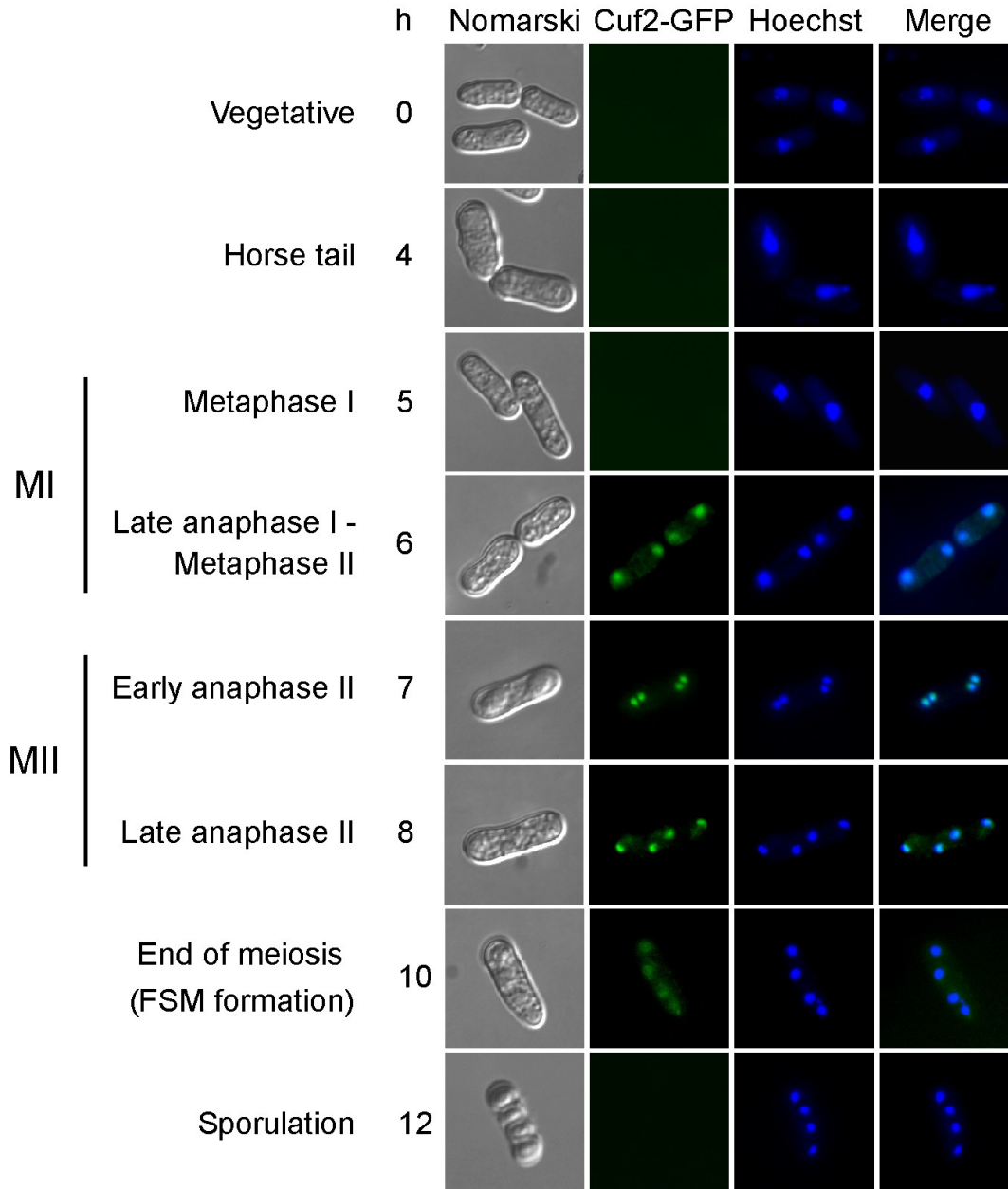


Fig. 4. *Analysis of Cuf2-GFP localization during both meiosis and sporulation.* The Cuf2-GFP fluorescence signal (center left) was observed at different stages of meiosis following the azygotic meiotic induction of a $h^+/h^- \text{cuf2}\Delta/\text{cuf2}\Delta \text{cuf2}^+-\text{GFP}/\text{cuf2}^+-\text{GFP}$ strain. Once induced, azygotic meiotic cells were differentiated under basal conditions. Cuf2-GFP was observed at each extremity of the cell at the end of the first meiotic division (MI) that is to say at anaphase I. Cuf2-GFP followed the segregation of chromatids until late in anaphase II when the second meiotic division (MII) occurred in early anaphase II. The Cuf2-GFP fluorescence signal was detected during the FSM formation (i.e. at the end of meiosis), but disappeared during spore formation. Cells at different stages of meiosis were stained using Hoechst 33342 to visualize the DNA (centre right). The merged images are shown in the far right panels. Nomarski optics (far left) were used to monitor cell morphology.

A subset of middle-phase meiotic genes show an elevated and sustained expression in cells lacking Cuf2. Based on the observations that Cuf2 co-localized with the chromosomal material (Fig. 4) and contained a putative DNA binding region (Fig. 1), we hypothesized that Cuf2 could participate in the regulation of the meiotic genes during the sexual differentiation process. This possibility was investigated using a microarray approach to determine whether meiosis-specific genes were differentially expressed as a function of Cuf2 status. A *pat1-114/pat1-114 cuf2Δ/cuf2Δ* mutant strain and a *pat1-114/pat1-114* control strain were pre-synchronized in G1 by nitrogen starvation, and were then incubated at 34°C so as to inactivate the Pat1 kinase. These conditions were set to initiate and proceed through synchronous meiosis under basal conditions. Microarrays were hybridized with probes derived from RNA isolated from either *cuf2Δ/cuf2Δ* mutant cells or control (*cuf2⁺/cuf2⁺*) cells. The analysis of gene expression profiling data obtained nine hours after meiotic induction revealed that 247 genes were expressed at higher levels in the *cuf2Δ/cuf2Δ* mutant cells (averaging ≥ 1.5 -fold) (Fig. 5A; Supplemental Table S1). Conversely, the data also revealed that 298 genes were expressed at lower levels in the *cuf2Δ/cuf2Δ* mutant cells (averaging ≥ 1.5 -fold) (Fig. 5A; Supplemental Table S5). The reason why we selected the 9-h time point for microarray experiments was based on the fact that we wanted to leave time of the translational process and the protein product (Cuf2) to take place and operate after the production of the *cuf2⁺* transcripts in *cuf2⁺/cuf2⁺* cells.

As previously reported, the transcription profiles of the meiotic cell cycle have defined four successive waves of gene expression that coincide with the major meiotic phases. These are, wave 1 in response to nutrient starvation (nutrient-responsive genes), wave 2 that involves premeiotic replication and recombination (early meiotic genes), wave 3 during which the meiotic divisions occur (middle meiotic genes), and wave 4 that is associated with spore formation (late meiotic genes) [14]. Among the 247 genes that were expressed at higher levels in the absence of Cuf2, 149 were classified as either early (4), middle (144) or late (1) meiotic genes (Supplemental Table S2). The other 98 genes were unclassified with respect to the expression waves. Strikingly, 144 out of a total of 149 genes classified were middle meiotic genes (97%). The expression levels of these 144 genes were up-

regulated and remained at high steady-state levels even during late meiosis when their expression levels normally were reduced in order to return them to a basal level of expression.

Some of the genes with increased expression levels in the absence of Cuf2 could be grouped together based on their predicted protein products or meiotic-specific profiles of expression. Some groups of proteins displayed conserved homologous domains that were potentially functionally important. One example of these groups included the meiotic genes encoding the family of uncharacterized DUF999 proteins of which 9 members were identified (Fig. 5B; Supplemental Tables S2 and S4). A second group of 15 genes, which encoded the Wtf family of proteins, was also expressed at higher levels in *cuf2Δ/cuf2Δ* mutant cells. *wtf* genes are known to be flanked by intergenic regions that contained long terminal repeat fragments of retrotransposons, and are transcribed during meiosis [32]. A third group includes several members of the Mug (meiotically up-regulated gene) family of proteins that were abnormally up-regulated in the absence of Cuf2 (Supplemental Table S4).

Because the results indicated that Cuf2 may have a role in repressing middle meiotic genes, we concentrated our efforts on this aspect in the present study. To assess whether the microarray analyses were successful in identifying the up-regulated genes in *cuf2Δ/cuf2Δ* mutant cells, RNase protection assays were performed using an independent biological trial to examine the relative expression levels of four middle-phase meiotic genes: *SPAC1B2.03c*⁺, *wtf13*⁺, *SPBC1348.01*⁺ and *meu14*⁺. In the case of the *cuf2Δ/cuf2Δ* mutant strain, at all points examined after 10 h, the levels of these four mRNAs were up-regulated as compared to those in control *cuf2*⁺/*cuf2*⁺ cells (Fig. 5C). As expected in experiments using either DNA microarray or RNase protection analysis, *SPAC1B2.03c*⁺, *wtf13*⁺, *SPBC1348.01*⁺ and *meu14*⁺ transcripts exhibited similar increases in transcript abundance in a strain lacking Cuf2. At the 10-h time point, RNase protection experiments revealed that the expression level of *SPAC1B2.03c*⁺, *wtf13*⁺, *SPBC1348.01*⁺ and *meu14*⁺ were increased 4.4-, 1.6-, 3.6- and 4.5-fold, respectively, while DNA microarray analysis showed increases of 3.1-, 2.4-, 2.5- and 2.2-fold, respectively (Fig. 5C and Supplemental Table S2).

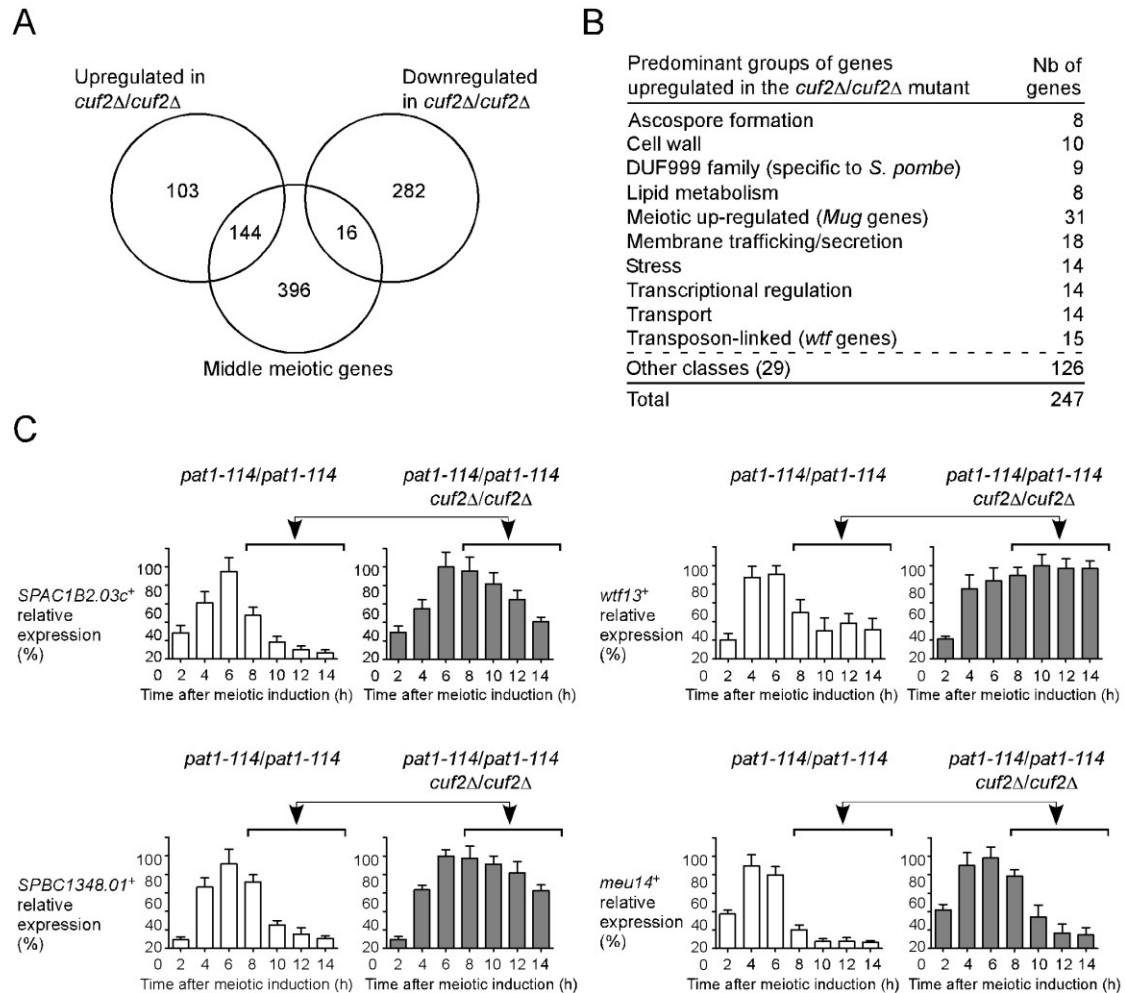


Fig. 5. Effect of *cuf2Δ/cuf2Δ* deletion on the expression of *S. pombe* genes. *A*, Venn diagram representing the numbers of genes with higher and lower expression levels in the *cuf2Δ/cuf2Δ* disruption strain as compared to the wild-type strain. The diagram also shows the overlap between middle-phase meiotic genes and all differentially expressed genes identified in *cuf2Δ/cuf2Δ* cells. *B*, Genes that exhibit higher expression levels in *cuf2Δ/cuf2Δ* cells were grouped in different functional families. *C*, *pat1-114/pat1-114* (*cuf2⁺/cuf2⁺*) and *pat1-114/pat1-114 cuf2Δ/cuf2Δ* strains were pre-synchronized by nitrogen starvation and were then induced to undergo synchronous meiosis under basal conditions. At the indicated times following meiotic induction, total RNA was prepared from both the *cuf2⁺/cuf2⁺* strain and its *cuf2Δ/cuf2Δ* mutant derivative and was analyzed by RNase protection assay. The histograms shown the quantifications of three independent RNase protection experiments. Ten hours after meiotic induction, the results indicate that the levels of the *SPAC1B2.03c⁺*, *wtf13⁺*, *SPBC1348.01⁺* and *meul4⁺* transcripts in *cuf2Δ/cuf2Δ* mutant cells were derepressed above those observed in *cuf2⁺/cuf2⁺* cells under the same conditions (as indicated with arrows and brackets).

Table S1. List of genes that showed elevated expression (averaging ≥ 1.5 -fold) in a *cuf2Δ/cuf2Δ* mutant (*pat1-114/pat1-114* synchronized cells) **Only the first 60 genes are shown below.

Systematic name	Common name	Synonyms	Amplitude	Description (GeneDB)
SPBC776.14	<i>plh1</i>		5,04	phospholipid-diacylglycerol acyltransferase Plh1
SPAC212.04c			3,70	S. pombe specific DUF999 family protein 1
SPCC4B3.12	<i>set9</i>		3,70	histone lysine methyltransferase Set9
SPBC27B12.02		SPBC30B4.10	3,69	sequence orphan
SPAC4G9.05	<i>mpf1</i>		3,65	meiotic PUF family protein 1
SPBC83.11			3,55	ER triose phosphate transmembrane transporter (predicted)
SPBC29A10.15	<i>orc1</i>	<i>orp1, cdc30</i>	3,42	origin recognition complex subunit Orc1
SPAC4F10.16c			3,12	P-type ATPase (predicted)
SPAC1B2.03c			3,07	GNS1/SUR4 family protein (predicted)
SPBC16A3.13	<i>meu7</i>		3,03	alpha-amylase homolog Aah4
SPAC24H6.13			2,97	DUF221 family protein implicated in Golgi to plasma membrane transport
SPCC63.04	<i>mok14</i>		2,90	alpha-1,4-glucan synthase Mok14
SPAC22A12.01c	<i>pso2</i>	<i>snm1</i>	2,90	DNA 5' exonuclease (predicted)
SPBC3H7.03c			2,87	2-oxoglutarate dehydrogenase (lipoamide) (predicted)
SPBC1773.08c	<i>omh4</i>		2,84	alpha-1,2-mannosyltransferase Omh4 (predicted)
SPBC32H8.02c	<i>nep2</i>	<i>mug120</i>	2,80	NEDD8 protease Nep2
SPBC27.03	<i>meu25</i>		2,78	sequence orphan Meu25
SPCC1020.13c			2,78	DDHD family phospholipase (predicted)
SPBC3H7.09	<i>mug142</i>		2,66	palmitoyltransferase (predicted)
SPACUNK4.12c	<i>mug138</i>		2,64	metallopeptidase (predicted)
SPAC3F10.06c			2,62	initiator methionine tRNA 2'-O-ribosyl phosphate transferase (predicted)
SPAC1639.01c		SPAC806.09c	2,56	GNS1/SUR4 family protein (predicted)
SPBC31A8.02		SPBC3D6.01	2,52	pseudogene
SPAC12B10.16c	<i>mug157</i>		2,49	conserved protein Mug157
SPBC2G2.10c	<i>mug110</i>		2,48	sequence orphan
SPAC13G6.08			2,48	Cdc20/Fizzy subfamily WD repeat protein
SPBCPT2R1.01c		SPBPB2B2.20c	2,47	S. pombe specific DUF999 protein family 9
SPBC1348.01			2,46	S. pombe specific DUF999 protein family 5
SPBCPT2R1.04c			2,46	S. pombe specific DUF999 protein family 10
SPBC839.08c	<i>its8</i>		2,43	pig-N (predicted)
SPBC1773.11c	<i>mug89</i>		2,43	CDC50 domain protein, implicated in signal transduction (predicted)
SPAC8C9.09c	<i>mug129</i>		2,41	sequence orphan
SPCC162.04c	<i>wtf13</i>		2,39	wtf element Wtf13
SPAC11G7.02	<i>pub1</i>	<i>pub1;elp2</i>	2,38	HECT-type ubiquitin-protein ligase E3 Pub1
SPAC17A5.04c	<i>mde10</i>	<i>mug139</i>	2,36	spore wall assembly ADAM family peptidase Mde10
SPAC977.06			2,32	S. pombe specific DUF999 family protein 3
SPCC285.07c	<i>wtf18</i>		2,30	wtf element Wtf5
SPAC25H1.09	<i>mde5</i>	<i>meu30, SPAC4A8.01</i>	2,29	alpha-amylase homolog Mde5
SPBC3H7.15	<i>hhp1</i>		2,28	serine/threonine protein kinase Hhp1
SPCC965.11c			2,28	amino acid transporter (predicted)
SPAC1610.03c	<i>crp79</i>	<i>meu5</i>	2,27	poly(A) binding protein Crp79
SPCC548.03c	<i>wtf4</i>	SPCC548.03	2,27	wtf element Wtf4

SPAPB2B4.04c		<i>pmc1</i>	2,27	vacuolar calcium transporting P-type ATPase P2 type, Pmc1
SPAC1039.11c		SPAC922.02c	2,27	alpha-glucosidase (predicted)
SPBC146.11c	<i>mug97</i>	<i>meu33</i>	2,26	meiotically upregulated gene Mug97
SPBP4H10.09	<i>rsv1</i>	<i>rsv1</i>	2,25	transcription factor Rsv1
SPCC1235.08c	<i>pdh1</i>		2,25	DUF1751 family protein
SPAC959.05c			2,25	protein disulfide isomerase (predicted)
SPAC3F10.07c	<i>mug91</i>		2,23	palmitoyltransferase complex Erf4 (predicted)
SPAC3F10.05c	<i>mug113</i>		2,20	T5orf172 family protein
SPBC1347.03	<i>meu14</i>		2,18	sporulation protein Meu14
SPAC3H8.08c			2,17	transcription factor (predicted)
SPBPB2B2.07c			2,17	S. pombe specific DUF999 protein family 7
SPBC3E7.15c	<i>lac1</i>	SPBC4F6.02c, <i>mug83</i>	2,16	sphingosine N-acyltransferase Lac1
SPAC212.01c			2,16	S. pombe specific DUF999 family protein 2
SPAC18B11.04	<i>ncs1</i>		2,15	related to neuronal calcium sensor Ncs1
SPCC188.12	<i>spn6</i>	SPCC584.09, <i>spn6</i>	2,14	septin Spn6 (predicted)
SPCC306.10	<i>wtf8</i>		2,14	wtf element Wtf8
SPAC144.12		<i>ppi</i>	2,11	ribose 5-phosphate isomerase (predicted)

Table S2. List of middle-phase meiotic genes that showed elevated expression (averaging ≥ 1.5 -fold) in a *cuf2Δ/cuf2Δ* mutant (*pat1-114/pat1-114* synchronized cells) **Only the first 50 genes are shown below.

Systematic name	Common name	Synonyms	Amplitude	Description (GeneDB)
SPAC212.04c			3,70	S. pombe specific DUF999 family protein 1
SPAC4G9.05	<i>mpf1</i>		3,65	meiotic PUF family protein 1
SPBC83.11			3,55	ER triose phosphate transmembrane transporter (predicted)
SPAC4F10.16c			3,12	P-type ATPase (predicted)
SPAC1B2.03c			3,07	GNS1/SUR4 family protein (predicted)
SPBC16A3.13	<i>meu7</i>		3,03	alpha-amylase homolog Aah4
SPCC63.04	<i>mok14</i>		2,90	alpha-1,4-glucan synthase Mok14
SPAC22A12.01c	<i>pso2</i>	<i>snm1</i>	2,90	DNA 5' exonuclease (predicted)
SPBC3H7.03c			2,87	2-oxoglutarate dehydrogenase (lipoamide) (predicted)
SPBC1773.08c	<i>omh4</i>		2,84	alpha-1,2-mannosyltransferase Omh4 (predicted)
SPBC32H8.02c	<i>nep2</i>	<i>mug120</i>	2,80	NEDD8 protease Nep2
SPBC27.03	<i>meu25</i>		2,78	sequence orphan Meu25
SPCC1020.13c			2,78	DDHD family phospholipase (predicted)
SPBC3H7.09	<i>mug142</i>		2,66	palmitoyltransferase (predicted)
SPACUNK4.12c	<i>mug138</i>		2,64	metallopeptidase (predicted)
SPAC3F10.06c			2,62	initiator methionine tRNA 2'-O-ribosyl phosphate transferase (predicted)
SPAC1639.01c		SPAC806.09c	2,56	GNS1/SUR4 family protein (predicted)
SPAC12B10.16c	<i>mug157</i>		2,49	conserved protein Mug157
SPBC2G2.10c	<i>mug110</i>		2,48	sequence orphan
SPAC13G6.08			2,48	Cdc20/Fizzy subfamily WD repeat protein
SPBCPT2R1.01c		SPBPB2B2.20c	2,47	S. pombe specific DUF999 protein family 9
SPBC1348.01			2,46	S. pombe specific DUF999 protein family 5
SPBC839.08c	<i>its8</i>		2,43	pig-N (predicted)
SPBC1773.11c	<i>mug89</i>		2,43	CDC50 domain protein, implicated in signal transduction

SPAC8C9.09c	<i>mug129</i>		2,41	sequence orphan
SPCC162.04c	<i>wtf13</i>		2,39	wtf element Wtf13
SPAC17A5.04c	<i>mde10</i>	<i>mug139</i>	2,36	spore wall assembly ADAM family peptidase Mde10
SPAC977.06			2,32	S. pombe specific DUF999 family protein 3
SPCC285.07c	<i>wtf18</i>		2,30	wtf element Wtf5
SPAC25H1.09	<i>mde5</i>	<i>meu30</i> , <i>SPAC4A8.01</i>	2,29	alpha-amylase homolog Mde5
SPBC3H7.15	<i>hhp1</i>		2,28	serine/threonine protein kinase Hhp1
SPCC965.11c			2,28	amino acid transporter (predicted)
SPAC1610.03c	<i>crp79</i>	<i>meu5</i>	2,27	poly(A) binding protein Crp79
SPCC548.03c	<i>wtf4</i>	SPCC548.03	2,27	wtf element Wtf4
SPAPB2B4.04c		<i>pmc1</i>	2,27	vacuolar calcium transporting P-type ATPase P2 type, Pmc1
SPAC1039.11c		SPAC922.02c	2,27	alpha-glucosidase (predicted)
SPBC146.11c	<i>mug97</i>	<i>meu33</i>	2,26	meiotically upregulated gene Mug97
SPBP4H10.09	<i>rsv1</i>	<i>rsv1</i>	2,25	transcription factor Rsv1
SPCC1235.08c	<i>pdh1</i>		2,25	DUF1751 family protein
SPAC959.05c			2,25	protein disulfide isomerase (predicted)
SPAC3F10.07c	<i>mug91</i>		2,23	palmitoyltransferase complex Erf4 (predicted)
SPAC3F10.05c	<i>mug113</i>		2,20	T5orf172 family protein
SPBC1347.03	<i>meu14</i>		2,18	sporulation protein Meu14
SPBPB2B2.07c			2,17	S. pombe specific DUF999 protein family 7
SPBC3E7.15c	<i>lac1</i>	SPBC4F6.02c, <i>mug83</i>	2,16	sphingosine N-acyltransferase Lac1
SPAC212.01c			2,16	S. pombe specific DUF999 family protein 2
SPCC188.12	<i>spn6</i>	SPCC584.09, <i>spn6</i>	2,14	septin Spn6 (predicted)
SPAC144.12		<i>ppi</i>	2,11	ribose 5-phosphate isomerase (predicted)
SPAC6F6.12			2,10	autophagy associated protein Atg24 (predicted)

Table S4. List of genes that showed elevated expression (averaging ≥ 1.5 -fold) in a *cuf2Δ/cuf2Δ* mutant (*pat1-114/pat1-114* synchronized cells) **All 247 genes are shown below.

Aerobic respiration				
SPBC29A3.10c	<i>atp14</i>		1,54	F1-ATPase subunit H (predicted)
SPBC1604.11	<i>atp17</i>		1,60	F0-ATPase subunit F (predicted)
SPAC1B2.04	<i>cox6</i>		1,61	cytochrome c oxidase subunit VI (predicted)
SPCC191.07	<i>cyc1</i>		1,62	cytochrome c (predicted)
SPBP23A10.16	<i>sdh4</i>	<i>tim18</i>	1,76	TIM22 inner membrane protein import complex anchor subunit Tim18
SPBC3H7.03c			2,87	2-oxoglutarate dehydrogenase (lipoamide) (predicted)

Amino acid metabolism				
SPAC31G5.14	<i>gcv1</i>	<i>n313</i>	1,65	glycine decarboxylase T subunit (predicted)
SPAC23A1.14c			1,64	uncharacterised trans-sulfuration enzyme (predicted)

APC component				
SPBC28E12.01c	<i>apc13</i>	SPBC9B6.12c	1,57	anaphase-promoting complex subunit Apc13
SPAC17C9.01c	<i>nuc2</i>	<i>apc3</i>	1,47	anaphase-promoting complex subunit Apc3

Ascospore formation				
SPAC23H3.13c	<i>gpa2</i>	<i>git8</i>	1,95	heterotrimeric G protein alpha-2 subunit Gpa2

SPAC17A5.04c	<i>mde10</i>	<i>mug139</i>	2,36	spore wall assembly ADAM family peptidase Mde10
SPBC1347.03	<i>meu14</i>		2,18	sporulation protein Meu14
SPCC63.04	<i>mok14</i>		2,90	alpha-1,4-glucan synthase Mok14
SPBC3H7.09	<i>mug142</i>		2,66	palmitoyltransferase (predicted)
SPAC22E12.16c	<i>pik1</i>		1,96	1-phosphatidylinositol 4-kinase Pik1
SPCC825.03c	<i>psy1</i>	<i>ssol</i>	1,50	SNARE Psy1
SPBC405.04c	<i>ypt7</i>		1,58	GTPase Ypt7

Autophagy				
SPAC4F10.07c	<i>atg13</i>	<i>apg13, mug78</i>	1,67	autophagy associated protein kinase regulatory subunit Atg13
SPAC823.16c	<i>mug179</i>	<i>atg18b</i>	1,86	WD repeat protein involved in autophagy Atg18b
SPAC6F6.12			2,10	autophagy associated protein Atg24 (predicted)

Carbohydrate metabolism				
SPBC1683.07	<i>mal1</i>		2,00	maltase alpha-glucosidase Mal1
SPAC25H1.09	<i>mde5</i>	<i>meu30</i>	2,29	alpha-amylase homolog Mde5
SPAC1039.11c		<i>SPAC922.02c</i>	2,27	alpha-glucosidase (predicted)
SPAC4G9.12			1,52	gluconokinase
SPBC1683.11c			1,50	isocitrate lyase (predicted)
SPBC32F12.10			1,48	phosphoglucomutase (predicted)
SPAC144.12		<i>ppi</i>	2,11	ribose 5-phosphate isomerase (predicted)

Cell cycle regulation				
SPAC24H6.05	<i>cdc25</i>	<i>sal2</i>	1,46	M phase inducer phosphatase Cdc25
SPBC660.14	<i>mik1</i>		1,65	mitotic inhibitor kinase Mik1
SPBC1D7.03	<i>mug80</i>		1,78	cyclin Clq1 (predicted)
SPBC582.03	<i>cdc13</i>		1,52	G2/M B-type cyclin Cdc13

Cell wall				
SPCC736.04c	<i>gma12</i>		1,74	alpha-1,2-galactosyltransferase Gma12
SPAC22E12.06c	<i>gmh3</i>		1,48	alpha-1,2-galactosyltransferase Gmh3
SPBC16A3.13	<i>meu7</i>		3,03	alpha-amylase homolog Aah4
SPAC18G6.03	<i>ypt3</i>		1,52	GTPase Ypt3
SPBC839.08c	<i>its8</i>		2,43	pig-N (predicted)
SPCC1906.01	<i>mpg1</i>		1,74	mannose-1-phosphate guanylttransferase Mpg1
SPBC1773.08c	<i>omh4</i>		2,84	alpha-1,2-mannosyltransferase Omh4 (predicted)
SPAC20H4.11c	<i>rho5</i>		2,03	Rho family GTPase Rho5
SPAC6G10.09			1,74	alpha glucosidase I Glsl (predicted)
SPAC589.12		<i>SPAC688.01</i>	1,45	glycosylceramide biosynthesis protein (predicted)

Checkpoint				
SPCC23B6.03c	<i>tel1</i>		1,47	ATM checkpoint kinase

Chromatin regulation				
SPAC4G9.06c	<i>chz1</i>		1,82	histone chaperone Chz1 (predicted)
SPAC16C9.05	<i>cph1</i>		1,88	Clr6 histone deacetylase associated PHD protein-1 Cph1
SPCC4B3.12	<i>set9</i>		3,70	histone lysine methyltransferase Set9

Chromosome segregation				
SPAC3G6.11	<i>chl1</i>		1,91	ATP-dependent DNA helicase Chl1 (predicted)
SPBC146.11c	<i>mug97</i>	<i>meu33</i>	2,26	meiotically upregulated gene Mug97
SPAC6G9.06c	<i>pcp1</i>		1,58	pericentrin Pcp1

Cytoskeleton				
SPAC3A11.02	<i>cps3</i>	<i>mug188</i>	1,66	zinc finger protein Cps3
SPAC328.08c	<i>tbc1</i>		1,52	tubulin specific chaperone cofactor C Tbc1 (predicted)
SPBC16E9.08		<i>mug101</i>	1,73	prospore membrane protein Mcp4/Mug101

DNA repair				
SPCC338.08	<i>ctp1</i>	<i>nip1, slr9, mug38</i>	1,62	CtIP-related endonuclease
SPBC3H7.15	<i>hhp1</i>		2,28	serine/threonine protein kinase Hhp1
SPAC23C4.12	<i>hhp2</i>		1,47	serine/threonine protein kinase Hhp2
SPAC22A12.01c	<i>pso2</i>	<i>snm1</i>	2,90	DNA 5' exonuclease (predicted)

DNA replication				
SPAC17H9.19c	<i>cdt2</i>	<i>sev1</i>	1,49	WD repeat protein Cdt2
SPBC29A10.15	<i>orc1</i>	<i>orp1, cdc30</i>	3,42	origin recognition complex subunit Orc1
SPAC2F3.04c	<i>rim1</i>		1,48	Mitochondrial single-stranded DNA binding protein Rim1

GPCR signaling				
SPBC32H8.07	<i>git5</i>	<i>gpb1</i>	1,64	heterotrimeric G protein beta subunit Git5

Heme biosynthesis				
SPAC24B11.13	<i>hem3</i>		1,45	hydroxymethylbilane synthase (predicted)

Lipid metabolism				
SPAC3H8.06	<i>aur1</i>		1,73	inositol phosphorylceramide synthase Aur1 (predicted)
SPAC21E11.08	<i>lcb2</i>	<i>SPAC2C4.02</i>	1,74	serine palmitoyltransferase Lcb2 (predicted)
SPBC776.14	<i>plh1</i>		5,04	phospholipid-diacylglycerol acyltransferase Plh1
SPAC22A12.08c			1,49	cardiolipin synthase/ hydrolase fusion protein (predicted)
SPCC1020.13c			2,78	DDHD family phospholipase (predicted)
SPAC1639.01c		<i>SPAC806.09c</i>	2,56	GNS1/SUR4 family protein (predicted)
SPAC1B2.03c			3,07	GNS1/SUR4 family protein (predicted)
SPAC11G7.05c			1,57	mitochondrial [acyl-carrier protein] S-malonyltransferase Mct1

Mating				
SPCC1442.01	<i>ste6</i>	<i>SPCC1450.17</i>	1,86	guanyl-nucleotide exchange factor Ste6

Meiosis				
SPAC4G9.05	<i>mpf1</i>		3,65	meiotic PUF family protein 1
SPBC2G2.10c	<i>mug110</i>		2,48	sequence orphan
SPCC338.02	<i>mug112</i>		1,66	dubious
SPAC3F10.05c	<i>mug113</i>		2,20	T5orf172 family protein

SPAC4F10.08	<i>mug126</i>		1,81	sequence orphan
SPAC8C9.09c	<i>mug129</i>		2,41	sequence orphan
SPCC330.04c	<i>mug135</i>		1,45	cell surface glycoprotein (predicted), DUF1773 family protein 3
SPACUNK4.12c	<i>mug138</i>		2,64	metallopeptidase (predicted)
SPAC12B10.16c	<i>mug157</i>		2,49	conserved protein Mug157
SPAC630.09c	<i>mug58</i>		2,02	glycerate kinase (predicted)
SPAC22F3.04	<i>mug62</i>		1,74	AMP binding enzyme (predicted)
SPBC1773.11c	<i>mug89</i>		2,43	CDC50 domain protein, implicated in signal transduction (predicted)
SPBC32H8.02c	<i>nep2</i>	<i>mug120</i>	2,80	NEDD8 protease Nep2
SPAC24C9.15c	<i>spn5</i>	<i>mde9, meu28</i>	2,03	septin Spn5
SPCC188.12	<i>spn6</i>	<i>spn6</i>	2,14	septin Spn6 (predicted)
SPBC1718.07c	<i>zfs1</i>	<i>moc4</i>	1,66	CCCH tandem zinc finger protein, human Tristetraprolin homolog Zfs1
SPBC28E12.02		<i>SPBC9B6.13</i>	1,78	RNA-binding protein
SPBC660.08			1,83	sequence orphan
SPBC28E12.04			1,59	sequence orphan
SPAC1F8.02c			1,47	sequence orphan

Membrane trafficking/secretion				
SPAC23C4.13	<i>bet1</i>		1,72	SNARE Bet1 (predicted)
SPAP14E8.03	<i>bos1</i>		1,68	SNARE, bos1
SPAC4F8.01	<i>did4</i>	<i>vps2</i>	1,49	vacuolar sorting protein Did4
SPCC24B10.17	<i>emp24</i>		1,73	COPII-coated vesicle component Emp24 (predicted)
SPBC3E7.15c	<i>lac1</i>	<i>SPBC4F6.02c</i>	2,16	sphingosine N-acyltransferase Lac1
SPAC2E1P5.02c	<i>mug109</i>		1,78	Rab GTPase binding protein upregulated in meiosis II (predicted)
SPAC959.02	<i>sec17</i>		1,95	alpha SNAP (predicted)
SPAC1834.11c	<i>sec18</i>		1,52	secretory pathway protein Sec18 (predicted)
SPCC31H12.07	<i>sec231</i>	<i>sec23a</i>	1,58	COPII cargo receptor subunit Sec23a (predicted)
SPBC8D2.20c	<i>sec31</i>		1,68	COPII-coated vesicle component Sec31 (predicted)
SPBC36B7.03	<i>sec63</i>		1,92	ER protein translocation subcomplex subunit Sec63 (predicted)
SPBC26H8.02c	<i>sec9</i>		1,57	SNAP-25 homologue, t-SNARE component Sec9
SPBC16E9.09c			1,57	COPII vesicle coat component Erp5/Erp6 (predicted)
SPAC17A5.08			1,49	COPII-coated vesicle component Erp2/3/4 (predicted)
SPAC24H6.13			2,97	DUF221 family protein implicated in Golgi to plasma membrane transport
SPBC119.12			1,64	Golgi matrix protein (predicted)
SPBC32F12.12c			1,48	Golgi membrane protein involved in vesicle-mediated transport
SPCC306.02c			1,57	Rab GTPase binding (predicted)

Metal homeostasis				
SPAC1142.06	<i>get3</i>		1,68	GET complex ATPase subunit Get3 (predicted)
SPAC18B11.04	<i>ncs1</i>		2,15	related to neuronal calcium sensor Ncs1
SPAC22H10.13	<i>zym1</i>		2,06	metallothionein Zym1
SPAPB2B4.04c		<i>pmc1</i>	2,27	vacuolar calcium transporting P-type ATPase P2 type, Pmc1

Morphogenesis				
SPAC17G8.14c	<i>pck1</i>	<i>SPAC22H10.01c</i>	1,81	protein kinase C (PKC)-like Pck1
SPBC1289.04c	<i>pob1</i>		1,87	Boi family protein

SPAC31G5.15	<i>psd3</i>		1,65	phosphatidylserine decarboxylase Psd3
SPAC1F7.04	<i>rho1</i>		1,51	Rho family GTPase Rho1
SPCC297.03	<i>ssp1</i>		1,87	serine/threonine protein kinase Ssp1

Non-coding RNA				
SPNCRNA.46	<i>prl46</i>		1,69	non-coding RNA (predicted)
SPNCRNA.56	<i>prl56</i>		1,92	antisense RNA (predicted)
SPNCRNA.09	<i>prl9</i>	<i>prl09</i>	1,50	non-coding RNA (predicted)
SPNCRNA.75			1,99	non-coding RNA (predicted)

Nucleotide metabolism				
SPAC24B11.05			1,83	pyrimidine 5'-nucleotidase (predicted)

Orphan				
SPBC409.11	<i>meu18</i>	<i>meu18</i>	1,47	sequence orphan
SPBC27.03	<i>meu25</i>		2,78	sequence orphan Meu25
SPAC1A6.06c	<i>meu31</i>		2,03	sequence orphan Meu31
SPAC27E2.11c			1,49	sequence orphan
SPAC8F11.05c			1,93	sequence orphan
SPAC11G7.01			1,71	sequence orphan
SPBC27B12.02		<i>SPBC30B4.10</i>	3,69	sequence orphan
SPAP27G11.16			1,69	sequence orphan

Others				
SPAC1952.13	<i>ned1</i>		1,84	lipin Ned1
SPCC1235.08c	<i>pdh1</i>		2,25	DUF1751 family protein
SPCC4G3.08	<i>psk1</i>		2,04	serine/threonine protein kinase Psk1
SPAC13G6.08			2,48	Cdc20/Fizzy subfamily WD repeat protein
SPAC12G12.07c			1,71	conserved fungal protein
SPAC30C2.08			1,55	conserved fungal protein
SPBPB2B2.08			1,50	conserved fungal protein
SPBC354.08c			1,55	DUF221 family protein
SPAP27G11.12			1,70	human c17orf28 ortholog 1
SPBP19A11.07c		<i>SPBP4H10.02c</i>	1,88	human c17orf28 ortholog 2
SPCC1620.07c			1,50	lunapark homolog
SPBC947.15c			1,50	mitochondrial NADH dehydrogenase (predicted)
SPAC24B11.09			2,00	mitochondrial protein, predicted, human BRP44 ortholog
SPBC31A8.02		<i>SPBC3D6.01</i>	2,52	pseudogene
SPBPB7E8.02			1,45	PSP1 family protein
SPAC4F10.16c			3,12	P-type ATPase (predicted)
SPAC25G10.01		<i>SPAC2C4.18</i>	1,52	RNA-binding protein
SPBC14C8.13			1,46	SRR1 family protein
SPAPB2B4.07			2,09	ubiquitin family protein, human UBD1 homolog
SPCPJ732.02c			2,03	xylulose kinase (predicted)
SPBC1271.05c			1,60	zf-AN1 type zinc finger protein

Post-transcriptional regulation				
--	--	--	--	--

SPAC821.04c	<i>cid13</i>		1,61	poly(A) polymerase Cid13
SPAC1610.03c	<i>crp79</i>	<i>meu5</i>	2,27	poly(A) binding protein Crp79
SPBC530.14c	<i>dsk1</i>		1,68	SR protein-specific kinase Dsk1
SPAC20H4.09			1,64	ATP-dependent RNA helicase, spliceosomal (predicted)
SPAC23A1.09			1,50	RNA-binding protein (predicted)
SPBC3F6.04c			1,70	U3 snoRNP protein Nop14 (predicted)

Protein modification				
SPBC1861.03	<i>mak10</i>		1,47	NatC N-acetyltransferase complex subunit Mak10 (predicted)
SPBC1271.02	<i>stt3</i>	<i>stt3</i>	1,47	oligosaccharyltransferase subunit Stt3

Protein trafficking				
SPCC962.03c	<i>cut15</i>		1,45	karyopherin Cut15
SPAC3F10.07c	<i>mug91</i>		2,23	palmitoyltransferase complex Erf4 (predicted)
SPAC17G6.09	<i>sec62</i>		1,75	ER protein translocation subcomplex subunit Sec62 (predicted)

Proteolysis				
SPBC8D2.01	<i>gsk31</i>		1,57	serine/threonine protein kinase Gsk31, gsk31
SPBC25B2.11	<i>pof2</i>		1,45	F-box protein Pof2
SPAC11G7.02	<i>pub1</i>	<i>pub1;elp2</i>	2,38	HECT-type ubiquitin-protein ligase E3 Pub1
SPCC1259.15c	<i>ubc11</i>	<i>ubcdp, ubcp4</i>	1,78	ubiquitin conjugating enzyme E2-C, Ubc11
SPAC20H4.10	<i>ufd2</i>		1,55	ubiquitin-protein ligase E4 (predicted)
SPAC1782.01		<i>SPAPYUG7.07</i>	1,89	proteasome component Ecm29

S. pombe specific				
SPAC212.04c			3,70	<i>S. pombe</i> specific DUF999 family protein 1
SPAC212.01c			2,16	<i>S. pombe</i> specific DUF999 family protein 2
SPAC977.06			2,32	<i>S. pombe</i> specific DUF999 family protein 3
SPBCPT2R1.04c			2,46	<i>S. pombe</i> specific DUF999 protein family 10
SPAC750.06c			2,00	<i>S. pombe</i> specific DUF999 protein family 4
SPBC1348.01			2,46	<i>S. pombe</i> specific DUF999 protein family 5
SPBC1348.07			1,59	<i>S. pombe</i> specific DUF999 protein family 6
SPBPB2B2.07c			2,17	<i>S. pombe</i> specific DUF999 protein family 7
SPBCPT2R1.01c		<i>SPBPB2B2.20c</i>	2,47	<i>S. pombe</i> specific DUF999 protein family 9

Scaffold				
SPBC244.01c	<i>sid4</i>		1,70	SIN component scaffold protein Sid4

Spindle pole body component				
SPBC365.15	<i>alp4</i>		1,74	gamma tubulin complex Spc97/GCP2 subunit Alp4
SPCC1739.08c			1,69	short chain dehydrogenase (predicted)

Sterol biosynthesis				
SPBC713.12	<i>erg1</i>		1,53	squalene monooxygenase Erg1 (predicted)
SPBC3F6.02c			1,45	3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase/delta 5-->4-isomerase

Stress				
---------------	--	--	--	--

SPAC13F5.03c	<i>gld1</i>		1,96	mitochondrial glycerol dehydrogenase Gld1
SPAC13C5.06c	<i>mug121</i>		1,83	sequence orphan
SPBC1604.01	<i>mug158</i>	SPBC1677.01c	1,51	sulfatase modifying factor 1 related (predicted)
SPAC1F3.09	<i>mug161</i>		1,56	CwfJ family protein, splicing factor (predicted)
SPAPYUG7.06	<i>mug67</i>		1,96	PPPDE peptidase family (predicted)
SPCC1183.09c	<i>pmp31</i>	<i>mug75</i>	1,80	plasma membrane proteolipid Pmp31
SPCC4F11.02	<i>ptc1</i>		1,51	protein phosphatase 2C Ptc1
SPAC4C5.02c	<i>ryh1</i>	<i>hos1</i>	2,02	GTPase Ryh1
SPAC19G12.15c	<i>tpp1</i>		1,68	trehalose-6-phosphate phosphatase Tpp1
SPAC17H9.14c			1,45	protein disulfide isomerase
SPAC1F5.02			1,62	protein disulfide isomerase (predicted)
SPAC959.05c			2,25	protein disulfide isomerase (predicted)
SPBP4H10.10			1,49	rhomboid family protease
SPBC56F2.06			1,50	sequence orphan

Transcriptional regulation				
SPBC2F12.09c	<i>atf21</i>		1,85	transcription factor, Atf-CREB family Atf21
SPBP23A10.14c	<i>ell1</i>		1,54	RNA polymerase II transcription elongation factor SpELL
SPAC1142.08	<i>fhl1</i>	SPAC8C9.01	1,45	fork head transcription factor Fhl1
SPBC16G5.15c	<i>fkh2</i>	<i>fkh2</i>	1,68	fork head transcription factor Fkh2
SPBC19F8.07	<i>mcs6</i>	<i>crk1, mop1, cdk7</i>	1,53	cyclin-dependent protein kinase/CDK-activating kinase Mcs6
SPBC3B8.02	<i>php5</i>		1,50	CCAAT-binding factor complex subunit Php5
SPBP4H10.09	<i>rsv1</i>	<i>rsv1</i>	2,25	transcription factor Rsv1
SPBC336.07	<i>sfc3</i>		1,96	transcription factor TFIIIC complex B box binding subunit Sfc3
SPCC285.17	<i>spp27</i>	<i>uaf30</i>	2,05	RNA polymerase I upstream activation factor complex subunit Spp27
SPBC354.05c	<i>sre2</i>		1,47	membrane-tethered transcription factor (predicted)
SPBC2A9.10			1,47	Bin3 family, transcriptional and translational regulator (predicted)
SPAC227.15			1,52	protein phosphatase regulatory subunit Reg1 (predicted)
SPAC3H8.08c			2,17	transcription factor (predicted)
SPBC17D1.01		SPBC17D11.09	1,49	transcriptional regulatory protein Spp41 (predicted)

Translation				
SPBC2G2.07c	<i>mug178</i>		1,70	mitochondrial ribosomal protein subunit L51-b (predicted)
SPAC24C9.14	<i>otu1</i>	<i>mug141</i>	1,84	ubiquitin-specific cysteine protease, OTU family, Otu1
SPBC23G7.05	<i>sui1</i>	<i>psu1</i>	1,54	translation initiation factor eIF1
SPBC21B10.03c			1,79	ataxin-2 homolog (predicted)
SPAC3A12.19			1,59	mitochondrial ribosomal protein subunit L27 (predicted)

Transport				
SPCC1235.14	<i>ght5</i>		1,49	hexose transporter Ght5
SPCC1235.13	<i>ght6</i>	<i>meu12</i>	1,56	hexose transporter Ght6
SPAC1751.01c	<i>gti1</i>		1,66	gluconate transporter inducer Gti1
SPBC19C2.11c	<i>mdm34</i>		1,64	mitochondrial outer membrane protein Mdm34 (predicted)
SPBC21B10.09			1,46	acetyl-CoA transporter (predicted)
SPCC965.11c			2,28	amino acid transporter (predicted)
SPAC5D6.04			1,46	auxin family transmembrane transporter (predicted)

SPCC1682.11c			1,47	choline transmembrane transporter family protein (predicted)
SPAC15A10.06			1,59	CPA1 sodium ion/proton antiporter (predicted)
SPBC83.11			3,55	ER triose phosphate transmembrane transporter (predicted)
SPAPB8E5.04c			1,49	Niemann-Pick disease type C2 protein hE1 homolog (predicted)
SPCC965.13			1,90	pyradoxal family membrane transporter (predicted)
SPAC3A12.06c			1,45	sodium/calcium exchanger (predicted)
SPBC947.06c			1,89	spermidine family transporter (predicted)

Transposon-related				
SPAC2E12.05	wtf1		1,71	pseudogene wtf element Wtf1
SPCC162.04c	wtf13		2,39	wtf element Wtf13
SPCC1450.08c	wtf16		1,53	wtf element Wtf16
SPCC285.06c	wtf17		1,60	wtf element Wtf17
SPCC285.07c	wtf18		2,30	wtf element Wtf5
SPCC1906.04	wtf20		1,89	wtf element Wtf20
SPCC576.16c	wtf22		2,04	pseudogene wtf element Wtf22
SPCC1620.02	wtf23		1,92	wtf element Wtf23
SPCC830.02	wtf24		1,66	gene wtf element Wtf24
SPCC1919.06c	wtf25		1,45	wtf element
SPCC548.02c	wtf3	SPCC548.02	1,51	pseudogene wtf element Wtf3 (no methionine)
SPCC548.03c	wtf4	SPCC548.03	2,27	wtf element Wtf4
SPCC553.05c	wtf6	SPCC553.05	1,82	pseudogene wtf element Wtf6
SPCC306.10	wtf8		2,14	wtf element Wtf8
SPCC970.11c	wtf9		1,93	wtf element Wtf9

tRNA modification				
SPAC6B12.09	trm10		1,88	tRNA m(1)G methyltransferase Trm10 (predicted)
SPAC3F10.06c			2,62	initiator methionine tRNA 2'-O-ribosyl phosphate transferase
SPCC736.06			1,60	mitochondrial aspartate-tRNA ligase (predicted)

Table S5. List of genes that show reduced expression in a *cuf2Δ/cuf2Δ* mutant (*pat1-114/pat1-114* synchronized cells)**Only ribosomal genes are shown below.

Ribosomal & translational processes				
SPCC1739.02c	mrpl22		1,67	mitochondrial ribosomal protein subunit L22 (predicted)
SPAC1B3.18c	mrps18		1,59	mitochondrial ribosomal protein subunit S18 (predicted)
SPAC26A3.07c	rpl1101	rpl11-1, rpl11	1,68	60S ribosomal protein L11 (predicted)
SPCC576.11	rpl15		1,55	60S ribosomal protein L15 (predicted)
SPAC1783.08c	rpl1502	rpl15-2	1,67	60S ribosomal protein L15b (predicted)
SPCC364.03	rpl1702	rpl17-2, rpl17	1,46	60S ribosomal protein L17 (predicted)
SPCC1682.14	rpl1902	rpl19-2	1,48	60S ribosomal protein L19B
SPBC365.03c	rpl2101	rpl21, rpl21-1	1,54	60S ribosomal protein L21 (predicted)
SPAC959.08	rpl2102	rpl21-2, rpl21	1,45	60S ribosomal protein L21 (predicted)
SPAC11E3.15	rpl22	SPAP8A3.01	1,63	60S ribosomal protein L22 (predicted)
SPAC3G9.03	rpl2301	rpl23-1	1,78	60S ribosomal protein L23
SPCC1322.11	rpl2302	rpl23-2	1,56	60S ribosomal protein L23
SPAC6G9.09c	rpl2401	rpl24-01, rpl24	1,70	60S ribosomal protein L24 (predicted)

SPCC330.14c	rpl2402	rpl24-2	1,61	60S ribosomal protein L24 (predicted)
SPBC776.11	rpl2801	rpl28-1	1,54	60S ribosomal protein L27/L28
SPCC5E4.07	rpl2802	rpl28-2, rpl28	1,88	60S ribosomal protein L27/L28
SPBC776.01	rpl29		1,74	60S ribosomal protein L29
SPAC9G1.03c	rpl3001	rpl30-1, rpl30	1,76	60S ribosomal protein L30 (predicted)
SPAC890.08	rpl31		1,81	60S ribosomal protein L31 (predicted)
SPAC23A1.08c	rpl3401	rpl34, rpl34-1	1,83	60S ribosomal protein L34
SPCC1322.15	rpl3402	rpl34, rpl34-2	1,52	60S ribosomal protein L34
SPCC613.05c	rpl35		1,61	60S ribosomal protein L35
SPCP31B10.08c	rpl35a	rpl33	1,58	60S ribosomal protein L35a
SPCC970.05	rpl3601	rpl36-1	1,93	60S ribosomal protein L36
SPBC405.07	rpl3602	rpl36-2, rpl36	1,84	60S ribosomal protein L36
SPCC1223.05c	rpl3702	rpl37-2, rpl37	1,75	60S ribosomal protein L37 (predicted)
SPAPB17E12.05	rpl3703	rpl37	1,68	60S ribosomal protein L37 (predicted)
SPAC30D11.12	rpl3802	rpl38-2, rps38	1,92	60S ribosomal protein L38 (predicted)
SPCC663.04	rpl39		1,80	60S ribosomal protein L39
SPAC3F10.18c	rpl4102	rpl41-2, rpl41, SPAC8F11.01c	1,62	60S ribosomal protein L41 (predicted)
SPAC15E1.03	rpl42	rpl36a	1,89	60S ribosomal protein L36/L42
SPBC800.04c	rpl4301	rpl43-1, rpl43, rpl37a-1	1,61	60S ribosomal protein L37a (predicted)
SPAC3H5.12c	rpl501	rpl5-1, rpl5	1,69	60S ribosomal protein L5 (predicted)
SPBC11C11.09c	rpl502	rpl5-2, rpl5b	1,58	60S ribosomal protein L5
SPCC622.18	rpl6		1,76	60S ribosomal protein L6 (predicted)
SPAC3H5.07	rpl702	rpl7-2, rpl7, rpl7b	1,59	60S ribosomal protein L7
SPAC1F7.13c	rpl801	rpl8-1, rpl18, rpk5a, rpl2-1	1,72	60S ribosomal protein L8 (predicted)
SPBC839.04	rpl803	rpl8-3, rpk5-b, rpkD4	1,61	60S ribosomal protein L8 (predicted)
SPAC4G9.16c	rpl901	rpl9-1	1,55	60S ribosomal protein L9
SPAC644.15	rpp101	rpp1-1	1,80	60S acidic ribosomal protein Rpp1-1
SPBC3B9.13c	rpp102	rpp1-2	1,79	60S acidic ribosomal protein Rpp1-2
SPCP1E11.09c	rpp103	rpp1-3	1,74	60S acidic ribosomal protein Rpp1-3
SPBC23G7.15c	rpp202	rpp2-2	1,71	60S acidic ribosomal protein P2B subunit
SPAC31G5.03	rps1101	rps11-1	1,56	40S ribosomal protein S11 (predicted)
SPCC962.04	rps1201	rps12-1, rps12	1,95	40S ribosomal protein S12 (predicted)
SPAC3H5.05c	rps1401	rps14-1, rps14	1,54	40S ribosomal protein S14 (predicted)
SPCC1393.03	rps1501	rps15-1	1,58	40S ribosomal protein S15 (predicted)
SPBC18H10.14	rps1601	rps16-1	1,55	40S ribosomal protein S16 (predicted)
SPAC664.04c	rps1602	rps16-2, rps16	1,53	40S ribosomal protein S16 (predicted)
SPCC24B10.09	rps1702	rps17-2, rps17	1,45	40S ribosomal protein S17 (predicted)
SPBC16D10.11c	rps1801	rps18-1	1,68	40S ribosomal protein S18 (predicted)
SPCC1259.01c	rps1802	rps18-2, SPCC825.06c	1,70	40S ribosomal protein S18 (predicted)
SPBC649.02	rps1902	rps19-2, rps19	1,45	40S ribosomal protein S19 (predicted)
SPBC18E5.06	rps21		1,49	40S ribosomal protein S21
SPAC5D6.01	rps2202	rps22-2, rps15a-2	1,45	40S ribosomal protein S15a (predicted)
SPAC23C11.02c	rps23		1,56	40S ribosomal protein S23 (predicted)
SPAC17G6.06	rps2401	rps24-1, rps24	1,49	40S ribosomal protein S24
SPAC694.05c	rps2502	rps25-2, rps25	1,56	40S ribosomal protein S25 (predicted)
SPBC1685.10	rps27		1,90	40S ribosomal protein S27 (predicted)
SPAC25G10.06	rps2801	rps28-1	1,69	40S ribosomal protein S28 (predicted)
SPCC285.15c	rps2802	rps28-2, rps28	1,78	40S ribosomal protein S28, Rps2802

SPBC1685.09	<i>rps29</i>		1,81	40S ribosomal protein S29 (predicted)
SPAC8C9.08	<i>rps5</i>		1,64	40S ribosomal protein S5 (predicted)
SPAC328.10c	<i>rps502</i>	<i>rps5-2</i>	1,66	40S ribosomal protein S5 (predicted)
SPAPB1E7.12	<i>rps602</i>	<i>rps6-2, rps6</i>	1,61	40S ribosomal protein S6 (predicted)
SPAC2C4.16c	<i>rps801</i>	<i>rps8-1</i>	1,47	40S ribosomal protein S8
SPAC24H6.07	<i>rps901</i>	<i>rps9-1, rps9a</i>	1,51	40S ribosomal protein S9
SPCC1450.04	<i>tef5</i>		1,55	translation elongation factor EF-1 beta subunit (eEF1B)
SPAC4D7.09	<i>tif223</i>		1,53	translation initiation factor eIF2B gamma subunit (predicted)
SPAC26H5.10c	<i>tif51</i>		1,78	translation elongation factor eIF5A (predicted)
SPBC336.10c	<i>tif512</i>		1,56	translation elongation factor eIF5A (predicted)
SPCC1919.09	<i>tif6</i>		1,45	translation initiation factor eIF6
SPRRNA.03			1,87	5S rRNA
SPRRNA.10			1,88	5S rRNA
SPRRNA.32			1,83	5S rRNA
SPRRNA.37			1,90	5S rRNA
SPBC25B2.01		SPBC2G5.08	1,66	elongation factor 1 alpha related protein (predicted)
SPCC1183.02			1,46	glutathione S-transferase
SPAC1B3.04c			1,76	mitochondrial GTPase involved in translation Guf1 (predicted)
SPCC11E10.07c			1,76	translation initiation factor eIF2B alpha subunit (predicted)

Interestingly, *cuf2Δ/cuf2Δ* cells showed sustained higher levels of *meu5⁺* expression (2.3-fold up-regulated according to the DNA microarray analysis) as compared with those observed in the control (*cuf2⁺/cuf2⁺*) cells. The *meu5⁺* gene encodes a RNA-binding protein that stabilizes meiosis-specific transcripts, especially those expressed in the middle meiotic phase [33]. To further investigate the relation between the *cuf2⁺* and *meu5⁺* genes, the *meu5⁺* regulon [33] was compared to that of *cuf2⁺*. In all 93 genes were found to be common to both regulons (Fig. 6A; Supplemental Table S3). Based on this observation, we hypothesized that, in the absence of Cuf2, *meu5⁺* expression was up-regulated. As a consequence, the Meu5 protein was present for a longer period of time, thereby stabilizing and extending the presence of several middle-phase meiotic transcripts to the later time points. To independently verify the microarray data, the diploid strains *pat1-114 cuf2⁺/cuf2⁺* and *pat1-114 cuf2Δ/cuf2Δ* were synchronized through meiosis and the *meu5⁺* mRNA levels were monitored at different time points after meiotic induction. Consistent with the microarray results, the *meu5⁺* mRNA levels were ~2.4-fold higher (in *cuf2Δ/cuf2Δ* cells as compared to those in the *cuf2⁺/cuf2⁺* control cells) after 10 h of meiotic induction and remained elevated (~4.2-fold higher) even after both 12 and 14 h of meiotic induction (Fig. 6B). To further investigate the effect of Meu5 on the expression profile of Cuf2-

regulated target genes, two additional diploid mutant strains, *pat1-114 meu5Δ/meu5Δ* and *pat1-114 cuf2Δ/cuf2Δ meu5Δ/meu5Δ*, were created. In the absence of Cuf2 (*cuf2Δ/cuf2Δ*), *wtf13⁺* and *SPAC1B2.03⁺* transcripts were found to be significantly increased after 10 h of meiotic induction (Figs 5C, 6C and D). In contrast, only very low amounts of the *wtf13⁺* and *SPAC1B2.03⁺* transcripts were detected in *pat1-114 meu5Δ/meu5Δ* cells (Fig. 6, C and D). These results correlate well with the concept that Meu5 stabilizes and extends the presence of *wtf13⁺* and *SPAC1B2.03⁺* mRNAs to the later meiotic time points. In cells lacking both Cuf2 and Meu5 (*cuf2Δ/cuf2Δ meu5Δ/meu5Δ*), the levels of *wtf13⁺* and *SPAC1B2.03⁺* mRNAs were found to be slightly higher as compared with those observed in *pat1-114 meu5Δ/meu5Δ*, but lower as compared with those detected in *pat1-114 cuf2Δ/cuf2Δ* cells (Fig. 6, C and D). Taken together, the results strongly suggest that Cuf2 is a meiosis-specific regulator that functions in a timely, controlled repression of middle genes during meiotic differentiation. Furthermore, the results suggest that Cuf2 and Meu5 have opposite effects on common meiosis-specific genes, specifically that Cuf2 down-regulates middle-phase transcripts, while Meu5 stabilizes the same transcripts.

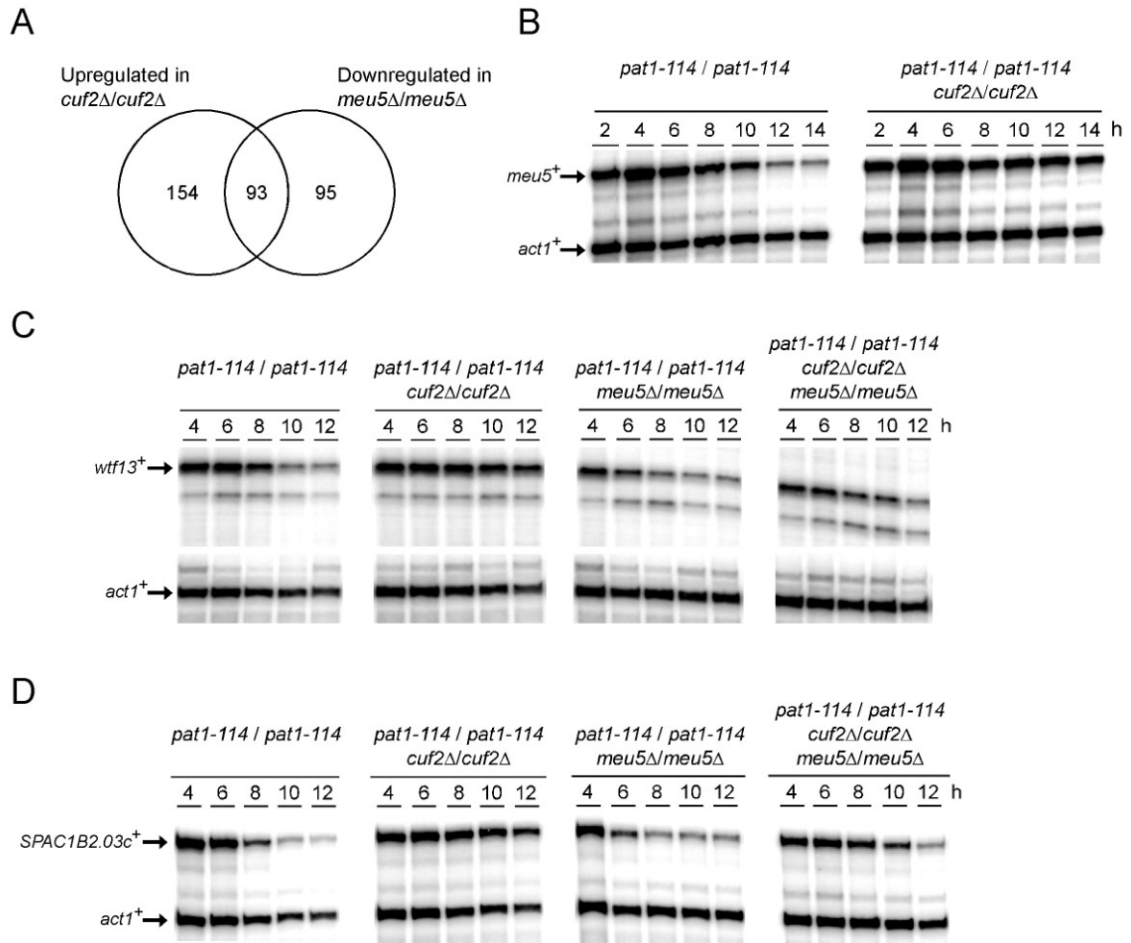


Fig. 6. *cuf2Δ* and *meu5Δ* gene disruptions have opposite effects on common meiosis-specific genes. *A*, Venn diagram representing the overlap between the *cuf2*⁺- and the *meu5*⁺-dependent genes. *B*, Total RNA from both the *pat1-114/pat1-114* (*cuf2*⁺/*cuf2*⁺) and *pat1-114/pat1-114 cuf2Δ/cuf2Δ* disruption strains was analyzed throughout meiosis and sporulation. A representative RNase protection experiment of the effect of the absence of Cuf2 on the expression of the *meu5*⁺ transcript (especially 10 to 14 h after meiotic induction) is shown. *C-D*, Cultures of *pat1-114/pat1-114*, *pat1-114/pat1-114 cuf2Δ/cuf2Δ*, *pat1-114/pat1-114 meu5Δ/meu5Δ* and *pat1-114/pat1-114 cuf2Δ/cuf2Δ meu5Δ/meu5Δ* diploid cells were synchronously induced into meiosis under basal conditions. Total RNA was isolated from culture aliquots taken at the indicated time points. After RNA preparation, the *wtf13*⁺ and *SPAC1B2.03c*⁺ steady-state mRNA levels were analyzed by RNase protection assays using actin (*act1*⁺) as an internal control. The results shown are representative of three independent experiments.

Table S3. List of genes that showed elevated expression (averaging ≥ 1.5-fold) in both *cuf2Δ/cuf2Δ* and *meu5Δ/meu5Δ* mutants (*pat1-114/pat1-114* synchronized cells). **All 93 genes are shown below.

Systematic name	Common name	Synonyms	Amplitude	Description (GeneDB)
-----------------	-------------	----------	-----------	----------------------

SPAC212.04c			3,70	S. pombe specific DUF999 family protein 1
SPAC4G9.05	<i>mpf1</i>		3,65	meiotic PUF family protein 1
SPAC4F10.16c			3,12	P-type ATPase (predicted)
SPAC1B2.03c			3,07	GNS1/SUR4 family protein (predicted)
SPBC16A3.13	<i>meu7</i>		3,03	alpha-amylase homolog Aah4
SPAC24H6.13			2,97	DUF221 family protein implicated in Golgi to plasma membrane transport
SPCC63.04	<i>mok14</i>		2,90	alpha-1,4-glucan synthase Mok14
SPAC22A12.01c	<i>pso2</i>	<i>snm1</i>	2,90	DNA 5' exonuclease (predicted)
SPBC1773.08c	<i>omh4</i>		2,84	alpha-1,2-mannosyltransferase Omh4 (predicted)
SPBC32H8.02c	<i>nep2</i>	<i>mug120</i>	2,80	NEDD8 protease Nep2
SPBC27.03	<i>meu25</i>		2,78	sequence orphan Meu25
SPCC1020.13c			2,78	DDHD family phospholipase (predicted)
SPBC3H7.09	<i>mug142</i>		2,66	palmitoyltransferase (predicted)
SPACUNK4.12c	<i>mug138</i>		2,64	metallopeptidase (predicted)
SPAC3F10.06c			2,62	initiator methionine tRNA 2'-O-ribosyl phosphate transferase (predicted)
SPAC1639.01c		SPAC806.09c	2,56	GNS1/SUR4 family protein (predicted)
SPAC12B10.16c	<i>mug157</i>		2,49	conserved protein Mug157
SPBC2G2.10c	<i>mug110</i>		2,48	sequence orphan
SPAC13G6.08			2,48	Cdc20/Fizzy subfamily WD repeat protein
SPBCPT2R1.01c		SPBPB2B2.20c	2,47	S. pombe specific DUF999 protein family 9
SPBC1348.01			2,46	S. pombe specific DUF999 protein family 5
SPBCPT2R1.04c			2,46	S. pombe specific DUF999 protein family 10
SPBC839.08c	<i>its8</i>		2,43	pig-N (predicted)
SPBC1773.11c	<i>mug89</i>		2,43	CDC50 domain protein, implicated in signal transduction (predicted)
SPAC8C9.09c	<i>mug129</i>		2,41	sequence orphan
SPCC162.04c	<i>wtf13</i>		2,39	wtf element Wtf13
SPAC17A5.04c	<i>mde10</i>	<i>mug139</i>	2,36	spore wall assembly ADAM family peptidase Mde10
SPAC977.06			2,32	S. pombe specific DUF999 family protein 3
SPAC25H1.09	<i>mde5</i>	<i>meu30</i>	2,29	alpha-amylase homolog Mde5
SPBC3H7.15	<i>hhp1</i>		2,28	serine/threonine protein kinase Hhp1
SPAC1610.03c	<i>crp79</i>	<i>meu5</i>	2,27	poly(A) binding protein Crp79
SPCC548.03c	<i>wtf4</i>	SPCC548.03	2,27	wtf element Wtf4
SPCC1235.08c	<i>pdh1</i>		2,25	DUF1751 family protein
SPAC959.05c			2,25	protein disulfide isomerase (predicted)
SPAC3F10.07c	<i>mug91</i>		2,23	palmitoyltransferase complex Erf4 (predicted)
SPAC3F10.05c	<i>mug113</i>		2,20	T5orf172 family protein
SPBPB2B2.07c			2,17	S. pombe specific DUF999 protein family 7
SPAC212.01c			2,16	S. pombe specific DUF999 family protein 2
SPAC18B11.04	<i>nsc1</i>		2,15	related to neuronal calcium sensor Ncs1
SPCC306.10	<i>wtf8</i>		2,14	wtf element Wtf8
SPAC144.12		<i>ppi</i>	2,11	ribose 5-phosphate isomerase (predicted)
SPAC6F6.12			2,10	autophagy associated protein Atg24 (predicted)
SPCC285.17	<i>spp27</i>	<i>uaf30</i>	2,05	RNA polymerase I upstream activation factor complex subunit Spp27
SPCC576.16c	<i>wtf22</i>		2,04	pseudogene wtf element Wtf22
SPCC4G3.08	<i>psk1</i>		2,04	serine/threonine protein kinase Psk1
SPCPJ732.02c			2,03	xylulose kinase (predicted)
SPAC1A6.06c	<i>meu31</i>		2,03	sequence orphan Meu31
SPAC4C5.02c	<i>ryh1</i>	<i>hos1</i>	2,02	GTPase Ryh1

SPAC630.09c	<i>mug58</i>		2,02	glycerate kinase (predicted)
SPAC750.06c			2,00	S. pombe specific DUF999 protein family 4
SPNCRNA.75			1,99	non-coding RNA (predicted)
SPAC13F5.03c	<i>gld1</i>		1,96	mitochondrial glycerol dehydrogenase Gld1
SPAPYUG7.06	<i>mug67</i>		1,96	PPPDE peptidase family (predicted)
SPBC336.07	<i>sfc3</i>		1,96	transcription factor TFIIC complex B box binding subunit Sfc3
SPAC959.02	<i>sec17</i>		1,95	alpha SNAP (predicted)
SPCC970.11c	<i>wtf9</i>		1,93	wtf element Wtf9
SPNCRNA.56	<i>prl56</i>		1,92	antisense RNA (predicted)
SPCC297.03	<i>ssp1</i>		1,87	serine/threonine protein kinase Ssp1
SPCC1442.01	<i>ste6</i>	SPCC1450.17	1,86	guanyl-nucleotide exchange factor Ste6
SPAC823.16c	<i>mug179</i>	<i>atg18b</i>	1,86	WD repeat protein involved in autophagy Atg18b
SPAC1952.13	<i>ned1</i>		1,84	lipin Ned1
SPAC13C5.06c	<i>mug121</i>		1,83	sequence orphan
SPAC24B11.05			1,83	pyrimidine 5'-nucleotidase (predicted)
SPCC1183.09c	<i>pmp31</i>	<i>mug75</i>	1,80	plasma membrane proteolipid Pmp31
SPAC2E1P5.02c	<i>mug109</i>		1,78	Rab GTPase binding protein upregulated in meiosis II (predicted)
SPCC24B10.17	<i>emp24</i>		1,73	COPII-coated vesicle component Emp24 (predicted)
SPAP27G11.12			1,70	human c17orf28 ortholog 1
SPCC1739.08c			1,69	short chain dehydrogenase (predicted)
SPAC19G12.15c	<i>tpi1</i>		1,68	trehalose-6-phosphate phosphatase Tpi1
SPAP14E8.03	<i>bos1</i>		1,68	SNARE, bos1
SPBC530.14c	<i>dsk1</i>		1,68	SR protein-specific kinase Dsk1
SPCC830.02	<i>wtf24</i>		1,66	gene wtf element Wtf24
SPBC1718.07c	<i>zfs1</i>	<i>moc4</i>	1,66	CCCH tandem zinc finger protein, human Tristetraprolin homolog Zfs1
SPAC20H4.09			1,64	ATP-dependent RNA helicase, spliceosomal (predicted)
SPBC32H8.07	<i>git5</i>	<i>gpb1</i>	1,64	heterotrimeric G protein beta subunit Git5
SPBC119.12			1,64	Golgi matrix protein (predicted)
SPBC19C2.11c	<i>mdm34</i>		1,64	mitochondrial outer membrane protein Mdm34 (predicted)
SPCC191.07	<i>cyc1</i>		1,62	cytochrome c (predicted)
SPAC15A10.06			1,59	CPA1 sodium ion/proton antiporter (predicted)
SPBC1348.07			1,59	S. pombe specific DUF999 protein family 6
SPBC405.04c	<i>ypt7</i>		1,58	GTPase Ypt7
SPBC26H8.02c	<i>sec9</i>		1,57	SNAP-25 homologue, t-SNARE component Sec9
SPBC8D2.01	<i>gsk31</i>		1,57	serine/threonine protein kinase Gsk31, gsk31
SPBC29A3.10c	<i>atp14</i>		1,54	F1-ATPase subunit H (predicted)
SPBC19F8.07	<i>mcs6</i>	<i>crk1, mop1</i>	1,53	cyclin-dependent protein kinase/CDK-activating kinase Mcs6
SPAC4G9.12			1,52	gluconokinase
SPAC227.15			1,52	protein phosphatase regulatory subunit Reg1 (predicted)
SPAC328.08c	<i>tbc1</i>		1,52	tubulin specific chaperone cofactor C Tbc1 (predicted)
SPCC825.03c	<i>psy1</i>	<i>sso1</i>	1,50	SNARE Psy1
SPCC1620.07c			1,50	lunapark homolog
SPBC32F12.10			1,48	phosphoglucosyltransferase (predicted)
SPCC1682.11c			1,47	choline transmembrane transporter family protein (predicted)
SPAC5D6.04			1,46	auxin family transmembrane transporter (predicted)

Deletion of $cuf2^+$ leads to forespore membrane (FSM) defects. The results shown above revealed that the expression levels of several middle-phase meiotic genes were sustained, even during late meiotic time points in the absence of Cuf2 (Fig. 5 and Supplemental Table S2). One possible explanation for this is that Cuf2 could be specifically required for the down-regulation processes that normally occurred only during the divisions steps. The absence of Cuf2 would trigger errors that could jeopardize both the quality and quantity of forespores. To test this possibility the meiotic differentiation in $h^+/h^- cuf2\Delta/cuf2\Delta$ diploid cells was compared to that of $h^+/h^- cuf2^+/cuf2^+$ control cells (Fig. 7A). Both strains were pre-synchronized in G1 by nitrogen starvation and were then synchronously induced to undergo azygotic meiosis. In the case of the control cells, 4 forespore membranes (FSMs) were detected 8 to 9 h after meiotic induction (Fig. 7A). The presence of FSMs was confirmed using a GFP-tagged Psy1 protein as Psy1 is a well-established FSM marker [34]. An abnormal number of FSMs were observed in the case of the $cuf2\Delta/cuf2\Delta$ mutant cells. Specifically, ~42% of the mutant cells exhibited more than 4 FSMs per ascus (Fig. 7, A and B, group ii), whereas ~18% of cells displayed 3 FSMs per ascus (Fig. 7, A and B, group iii). Many $cuf2\Delta/cuf2\Delta$ cells showed FSMs of various sizes (~15% of cells), including elongated FSMs with small buds forming a shape reminiscent of a shmoo (Fig. 7, A and B, group iv) as previously reported [35]. To confirm that the meiotic FSM maturation defect was due to the inactivation of $cuf2^+$, a $h^+/h^- cuf2\Delta/cuf2\Delta$ strain was created in which wild-type $cuf2^+$ -GFP/ $cuf2^+$ -GFP alleles were returned by integration and expressed under the control of the $cuf2^+$ promoter. In these experiments, normal FSM formation was observed when the strain underwent azygotic meiosis in a manner similar to that observed in control cells (Fig. 7B).

Further insight into the phenotype resulting from loss of Cuf2 function was gained by determining the presence of chromosomal DNA within each FSM structure. All asci generated from $cuf2^+/cuf2^+$ cells contained chromosomal DNA (Hoescht 33342-staining) and was surrounded by FSMs (Fig. 7C). Although 4 chromosomal DNA spots were also found in $cuf2\Delta/cuf2\Delta$ mutant cells, the chromosomal DNA spots were not all packaged into FSM structures (Fig. 7C and data not shown). Taken together, these results suggest that loss of Cuf2 leads to the formation of asci containing unpackaged chromosomal DNA in addition to the anucleated FSM shells observed with the shmoo-like FSM structures.

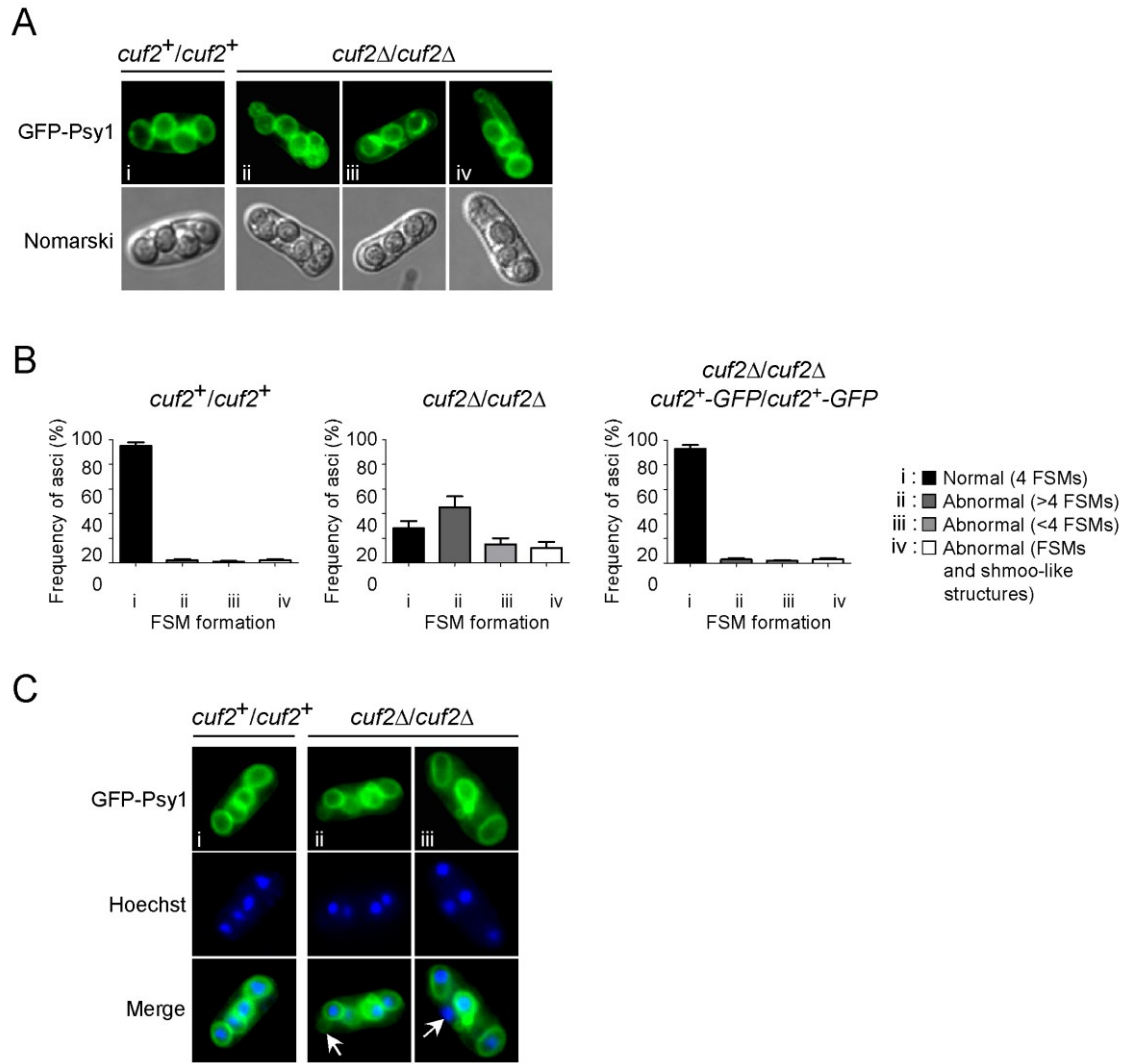


Fig. 7. The *cuf2Δ/cuf2Δ* mutant is defective in FSM formation. **A**, Both wild-type diploid (*cuf2⁺/cuf2⁺*) and *cuf2Δ/cuf2Δ* mutant cells expressing GFP-Psy1 were synchronously induced to undergo azygotic meiosis. At the 9 h time point, FSM formation was monitored by detecting the GFP-Psy1 signal by fluorescence microscopy. When GFP-Psy1 localized to 4 circular FSM structures, these FSMs were classified as normal (i). When GFP-Psy1 localized to either lesser or greater than 4 circular FSMs or shmoo-like structures, FSMs were classified as abnormal (ii, iii and iv). **B**, Histograms showing the percentages of each normal (i) and abnormal (ii, iii, iv) FSM structure in both wild-type (*cuf2⁺/cuf2⁺*) and *cuf2Δ/cuf2Δ* mutant cells, as well as in a diploid *cuf2Δ/cuf2Δ* disruption strain in which wild-type copies of the *cuf2⁺-GFP* fusion gene were reintegrated. **C**, Typical images of FSM structures 9 h after meiotic induction in both wild-type (*cuf2⁺/cuf2⁺*) and *cuf2Δ/cuf2Δ* mutant cells (top panels). Each strain had previously been transformed with pJK210GFP-Psy1, which encodes GFP-Psy1 that is used as an FSM-resident marker. Hoechst 33342 staining was used to visualize the chromosomal DNA (middle panels). The merged images

of the GFP-Psy1 and the Hoechst 33342 dye are shown in the bottom panels. Anucleated FSM structures, or unpackaged nuclei, are indicated by the white arrows.

Spore viability is reduced in $cuf2\Delta/cuf2\Delta$ mutant cells. We next asked whether the inactivation of Cuf2 that caused abnormal FSM structures was intrinsically linked to a decrease of spore viability. To answer this question $h^+/h^- cuf2\Delta/cuf2\Delta$ diploid cells were used, and the results obtained compared to those from either $h^+/h^- cuf2^+/cuf2^+$ or $h^+/h^- cuf2\Delta/cuf2\Delta$ cells in which a functional integrative plasmid harboring the $cuf2^+-GFP$ allele expressed under the control of the $cuf2^+$ promoter was present. After 12 h of induced azygotic meiosis, the cells were analyzed by performing tetrad dissection assays. Spores dissected from $h^+/h^- cuf2\Delta/cuf2\Delta$ asci exhibited a ~59 % decrease in viability as compared those of both wild-type and $h^+/h^- cuf2\Delta/cuf2\Delta cuf2^+-GFP/cuf2^+-GFP$ cells (Fig. 8A).

Tetrad dissections were also performed to determine whether $h^+/h^- cuf2\Delta/cuf2\Delta$ asci containing 4 spores were as viable as those containing 3 spores (Fig. 8B). Spores originating from asci containing 3 or 4 spores had reduced viabilities when returned to rich medium for germination. $h^+/h^- cuf2\Delta/cuf2\Delta$ asci containing 3 and 4 spores showed ~58 % and ~42 % decreases in viability, respectively, as compared to spores from control strains (data not shown). As shown in Fig. 8B, various viability ratios were obtained after the germination of spores originating from $h^+/h^- cuf2\Delta/cuf2\Delta$ cells (4/4 (29 %), 3/4 (19 %), 2/4 (29 %), 1/4 (14 %) and 0/4 (9 %); data not shown). Taken together, the results revealed that Cuf2 is important during the meiotic differentiation program in the proper formation of the FSM, which in turn is a prerequisite for spore viability.

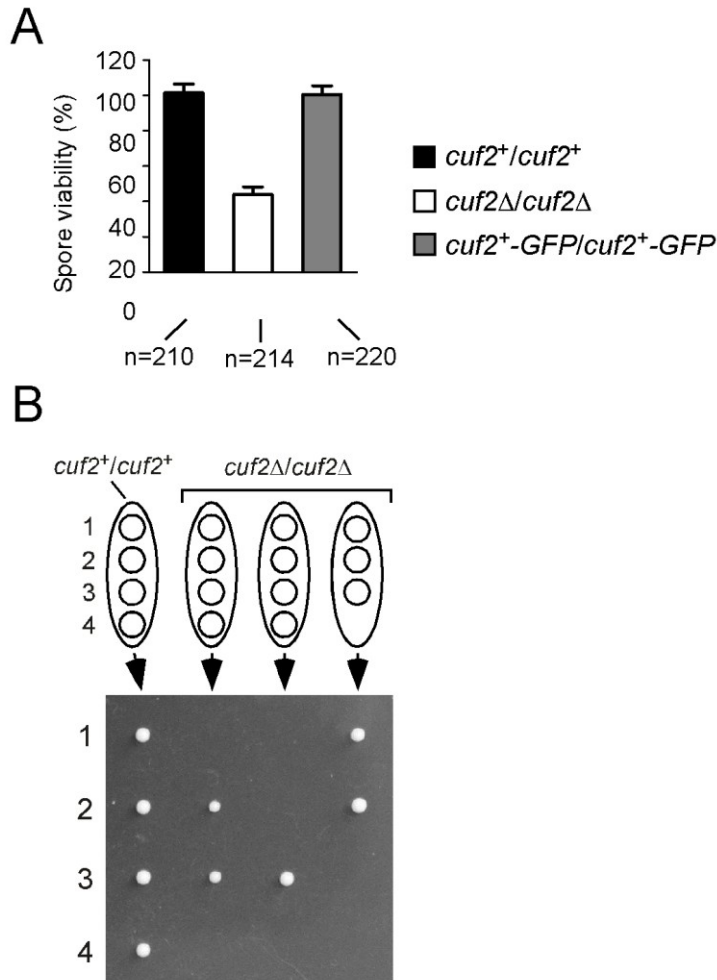


Fig. 8. *cuf2Δ/cuf2Δ* mutant cells display reduced spore viability. *A*, Both wild-type (*cuf2⁺/cuf2⁺*) and *cuf2Δ/cuf2Δ* mutant cells were allowed to sporulate under conditions of limiting nitrogen. Tetrad dissection analysis (>200 asci per strain; n = 210 and 214, respectively) revealed that ~59 % of the spores from *cuf2Δ/cuf2Δ* asci failed to germinate as compared to spores from wild-type (*cuf2⁺/cuf2⁺*) asci (~98 % germination). As an additional control, the mutant strain bearing the disrupted *cuf2Δ/cuf2Δ* alleles was used to reintegrate functional *cuf2⁺-GFP/cuf2⁺-GFP* alleles and was then examined for the formation of 4-spored asci. This control strain exhibited 97% of 4-spore asci (n = 220). *B*, Comparative typical results of tetrad dissection analysis in wild-type (*cuf2⁺/cuf2⁺*) and *cuf2Δ/cuf2Δ* mutant asci.

Discussion

Blast searches of the *S. pombe* proteome identified two proteins that contain a putative copper-fist-like domain. The first protein, Cuf1, activates the *ctr4⁺*, *ctr5⁺* and *ctr6⁺* genes, which all encode copper transport proteins [20,21,23,31, 38]. The second protein containing a putative copper-fist-like domain was Cuf2 for which relatively little data was

available [14]. Curiously, Cuf2 was found to be strictly expressed during meiosis. Because on this, Cuf2 became highly interesting as it represented the first example of a meiosis-specific copper-fist-like transcription factor. Consequently, the *cuf2*⁺ gene was isolated and analyzed. Transcriptome analyses of *S. pombe* cells undergoing synchronized meiosis permitted the identification of meiosis-specific transcripts. In these analyses, *cuf2*⁺ was consistently identified as being a meiosis-specific middle gene, exhibiting a peak of expression between 4 and 6 h after the induction of meiosis. Middle meiotic genes are transiently expressed during meiotic divisions when the segregation of the homologous chromosomes (MI), and ultimately of sister chromatids (MII) occurs. The meiosis-specific forkhead-type transcription factor Mei4 activates the expression of the majority of the middle meiotic genes [15,17]. Previous microarray experiments have suggested that *cuf2*⁺ expression requires Mei4 [15]. In agreement, the results presented here demonstrate that *cuf2*⁺ transcription relies on Mei4, since *cuf2*⁺ expression was completely abolished in a *mei4Δ/mei4Δ* mutant strain (Fig. 3). Analysis of the *cuf2*⁺ promoter revealed that it contains four putative consensus Mei4-binding FLEX sequences (positions -49 to -55, -335 to -341, -1104 to -1110 and -1209 to -1215) (the nucleotide numbers refer to the position relative to the A of the initiator codon of the *cuf2*⁺ gene) (data not shown). This observation is consistent with the genetic data and further suggests that Mei4 could directly activate *cuf2*⁺ expression.

The transcription of *cuf2*⁺ was unaffected when meiotic cells were treated with ≤50 μM TTM or ≤50 μM CuSO₄. However, cells that had been treated with ≥75 μM CuSO₄ consistently exhibited a timing defect in their meiotic progression (data not shown). Under toxic copper concentrations (e.g. ≥75 and 100 μM), *mei4*⁺ and *cuf2*⁺ expression profiles were delayed and overall reduced during the meiotic process (data not shown). These results suggested that toxic levels of copper could negatively affect the expression of several middle meiotic genes. Furthermore, we consistently observed that toxic copper levels (≥75 and 100 μM) affected the ability of meiotically induced cells to complete meiosis. Under these toxic levels of copper (≥75 and 100 μM), the ascospore maturation was abnormal (data not shown). These observations suggested that an excess of copper has a generic negative effect on meiotic gene expression, progression and maturation, rather

than specifically affecting the expression of *cuf2*⁺ and/or *mei4*⁺ (data not shown). This effect may be explained by the fact that in excess (≥ 75 and $100 \mu\text{M}$), copper may induce intracellular oxidative stress through the generation of hydroxyl radicals produced by the Fenton reaction [39]. Nevertheless, considering its copper-fist-like structure, it is not impossible that Cuf2 may be affected by the cellular status of copper.

The results presented indicate that the expression of *SPAC1B2.03c*⁺, *SPBC1348.01*⁺, *wtf13*⁺ and *meu14*⁺ middle genes is up-regulated in a *cuf2* Δ /*cuf2* Δ mutant strain ~10 to 14 h after meiotic induction. Moreover, analysis of genome-wide gene expression 9 h after meiotic induction revealed that the expression of ~247 genes was up-regulated (averaging ≥ 1.5 -fold) in a *cuf2* Δ /*cuf2* Δ mutant strain. Interestingly, these genes were associated with a large spectrum of possible cellular functions (Fig. 5B and Supplemental Table 4S), indicating that Cuf2 could act as a middle phase meiotic regulator rather than as a regulator of the gene expression of a specific homeostatic pathway. The microarray results also showed that 298 genes were down-regulated in *cuf2* Δ /*cuf2* Δ mutant cells (Supplemental Table 5S). Because several of these genes encode ribosomal proteins (~67), which may reflect a global decrease of the cellular metabolic status, we first concentrated our efforts on the analysis of the genes that were up-regulated in the absence of Cuf2.

In all conditions, *cuf2*⁺ mRNA was primarily detected between 4 to 6 h after meiotic induction. At the protein level, Cuf2 was first detected at the 4-h time point and was then maintained up to ~12 h following induction of meiosis. Cuf2-GFP was consistently observed when the first meiotic division occurred ~5-6 h after meiotic induction. The Cuf2-GFP fluorescent signal progressively decreased 10 to 12 h after meiotic induction, coinciding with mature spore appearance. Interestingly, Cuf2 repression activity was only observed ~9-10 h following the induction of meiosis, coinciding with the end of the meiotic divisions and the process of spore formation. Although the possibility that Cuf2 could have other functions or target genes between 4 and 8 h following induction of meiosis cannot be excluded, the results suggest that Cuf2 activity is regulated through middle meiosis. This suggestion is based on the observation that Cuf2 became active only once the second meiotic division was completed. It is possible that Cuf2 is subjected to post-translational

modifications, or that it interacts with potential co-repressors that are induced downstream of itself.

In the baker's yeast *S. cerevisiae*, the transcriptional regulator Sum1 prevents the expression of meiosis-specific genes in cells undergoing vegetative growth (i.e. in the mitotic cell cycle) [40]. Furthermore, it has been shown that Sum1 represses the expression of a subset of the middle meiotic genes during both early meiosis [41] and at the beginning of late meiosis [42]. Interestingly, the data presented here concerning the repression of middle meiotic genes by Cuf2 was reminiscent of the results obtained with the *S. cerevisiae* protein Sum1. However, Cuf2 is likely to be different from Sum1 as the *SUM1* gene is expressed during mitosis, whereas *cuf2*⁺ is not. During meiotic differentiation, *SUM1* is expressed in both the early- and the late-phases of meiosis, as well as during spore maturation, but not in the middle-phase [42,43]. In contrast, Cuf2 is expressed both in the middle-phase of meiosis and at the onset of late meiosis. In *S. cerevisiae*, it has been shown that the expression of Ndt80, the ortholog of *S. pombe* Mei4, is up-regulated in a *sum1Δ* null strain [42]. In contrast, in *S. pombe*, the *mei4*⁺ transcript was expressed at comparable levels in both the *cuf2Δ/cuf2Δ* mutant and the wild-type parental strains (data not shown). An alignment of the amino acid sequence of Cuf2 with that of Sum1 revealed no sequence similarities between the two proteins (data not shown). Collectively, all of these observations suggest that the Cuf2 and Sum1 functions diverge.

The *S. pombe* *meu5*⁺ gene is a meiosis-specific middle gene that encodes an RNA-binding protein which stabilizes transcripts from numerous genes that are expressed throughout middle-phase meiosis [33]. This post-transcriptional regulatory mechanism enhances the translation of ~188 transcripts, including that of *wtf13*⁺ [33]. In contrast, Cuf2 repressed the expression of several middle-phase genes at the conclusion of the meiotic divisions, thereby presumably reducing their translation rates during spore maturation (late-phase). Thus, Cuf2 and Meu5 have antagonistic roles with respect to the expression of middle-phase meiotic genes. Interestingly, a significant proportion (93/188) of the Meu5-stabilized transcripts was observed to be expressed at higher levels in *cuf2Δ/cuf2Δ* mutant cells than in wild-type cells. Moreover, the *meu5*⁺ gene itself was expressed at higher levels in a

cuf2Δ/cuf2Δ mutant than in a wild-type strain, especially 10 to 14 h after meiotic induction. This suggests that Cuf2 represses not only *meu5⁺* expression, but also that of approximately half of the genes encoding Meu5-stabilized transcripts. This synergic gene regulatory mechanism may optimize the extinction of middle-phase meiotic gene expression at the onset of late meiosis.

The characterization of the molecular mechanisms underlying meiosis revealed that the loss of key meiotic genes may lead to severe defects and could impair spore viability. In the absence of Cuf2, forespore membrane formation and ascospore maturation were abnormal. Considering the fact that during a given meiotic phase, global gene expression of the previous phase is down-regulated [14,15], the results suggest that the aberrant expression of the middle meiotic genes during late meiosis could have impaired both forespore membrane formation and ascospore maturation. Furthermore, tetrad dissection experiments revealed that spore viability was reduced in a *cuf2Δ/cuf2Δ* mutant strain. Surprisingly, 4 nuclei were systematically detected at the end of meiosis in *cuf2Δ/cuf2Δ* mutant asci, suggesting that the meiotic divisions were normal. However, a fraction of asci produced by *cuf2Δ/cuf2Δ* mutants revealed some anucleated forespore membranes. These results suggested that forespore membrane defects could have reduced the spore viability in *cuf2Δ/cuf2Δ* mutant cells. Taken together, these results further suggested that the Cuf2-dependent timely repression of the middle meiotic genes is critical to providing the correct gene product at the correct time, thereby contributing to normal forespore membrane biogenesis and optimal spore viability.

References

1. Handel MA, Schimenti JC (2010) Genetics of mammalian meiosis: Regulation, dynamics and impact on fertility. *Nat Rev Genet* 11: 124-136.
2. Marston AL, Amon A (2004) Meiosis: Cell-cycle controls shuffle and deal. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5: 983-997.
3. Kim AM, Vogt S, O'Halloran TV, Woodruff TK (2010) Zinc availability regulates exit from meiosis in maturing mammalian oocytes. *Nat Chem Biol* 6: 674-681.
4. Staub C (2001) A century of research on mammalian male germ cell meiotic differentiation in vitro. *J Androl* 22: 911-926.
5. Hogarth CA, Griswold MD (2010) The key role of vitamin A in spermatogenesis. *J Clin Invest* 120: 956-962.
6. Davis L, Smith GR (2001) Meiotic recombination and chromosome segregation in *Schizosaccharomyces pombe*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 8395-8402.
7. Li Y, Lam KS, Dasgupta N, Ye P (2010) A yeast's eye view of mammalian reproduction: Cross-species gene co-expression in meiotic prophase. *BMC Syst Biol* 4: 125.
8. Harigaya Y, Yamamoto M (2007) Molecular mechanisms underlying the mitosis-meiosis decision. *Chromosome Res* 15: 523-537.
9. Shimoda C, Nakamura T (2004) Control of late meiosis and ascopore formation. In: Egel R, editor. *The Molecular Biology of Schizosaccharomyces pombe*. Berlin, Germany. pp. 311-327.

10. Yamamoto M (2004) Initiation of meiosis. In: Egel R, editor. *The Molecular Biology of Schizosaccharomyces pombe*. Berlin, Germany. pp. 297-309.
11. Mata J, Bähler J (2006) Global roles of Ste11p, cell type, and pheromone in the control of gene expression during early sexual differentiation in fission yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 15517-15522.
12. Bähler J, Schuchert P, Grimm C, Kohli J (1991) Synchronized meiosis and recombination in fission yeast: observations with pat1-114 diploid cells. *Curr Genet* 19: 445-451.
13. Doll E, Molnar M, Cuanoud G, Octobre G, Latypov V, et al. (2008) Cohesin and recombination proteins influence the G1-to-S transition in azygotic meiosis in *Schizosaccharomyces pombe*. *Genetics* 180: 727-740.
14. Mata J, Lyne R, Burns G, Bähler J (2002) The transcriptional program of meiosis and sporulation in fission yeast. *Nat Genet* 32: 143-147.
15. Mata J, Wilbrey A, Bähler J (2007) Transcriptional regulatory network for sexual differentiation in fission yeast. *Genome Biol* 8: R217.
16. Horie S, Watanabe Y, Tanaka K, Nishiwaki S, Fujioka H, et al. (1998) The *Schizosaccharomyces pombe mei4+* gene encodes a meiosis-specific transcription factor containing a forkhead DNA-binding domain. *Mol Cell Biol* 18: 2118-2129.
17. Abe H, Shimoda C (2000) Autoregulated expression of *Schizosaccharomyces pombe* meiosis-specific transcription factor Mei4 and a genome-wide search for its target genes. *Genetics* 154: 1497-1508.

18. Winge DR (1998) Copper-regulatory domain involved in gene expression. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 58: 165-195.
19. Beaudoin J, Labbé S (2001) The fission yeast copper-sensing transcription factor Cuf1 regulates the copper transporter gene expression through an Ace1/Amt1-like recognition sequence. *J Biol Chem* 276: 15472-15480.
20. Labbé S, Peña MMO, Fernandes AR, Thiele DJ (1999) A copper-sensing transcription factor regulates iron uptake genes in *Schizosaccharomyces pombe*. *J Biol Chem* 274: 36252-36260.
21. Zhou H, Thiele DJ (2001) Identification of a novel high affinity copper transport complex in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *J Biol Chem* 276: 20529-20535.
22. Beaudoin J, Laliberté J, Labbé S (2006) Functional dissection of Ctr4 and Ctr5 amino-terminal regions reveals motifs with redundant roles in copper transport. *Microbiology* 152: 209-222.
23. Bellemare DR, Shaner L, Morano KA, Beaudoin J, Langlois R, et al. (2002) Ctr6, a vacuolar membrane copper transporter in *Schizosaccharomyces pombe*. *J Biol Chem* 277: 46676-46686.
24. Koch KA, Thiele DJ (1996) Autoactivation by a candida glabrata copper metalloregulatory transcription factor requires critical minor groove interactions. *Mol Cell Biol* 16: 724-734.
25. Turner RB, Smith DL, Zawrotny ME, Summers MF, Posewitz MC, et al. (1998) Solution structure of a zinc domain conserved in yeast copper-regulated transcription factors. *Nat Struct Biol* 5: 551-555.

26. Nevitt T, Ohrvik H, Thiele DJ (2012) Charting the travels of copper in eukaryotes from yeast to mammals. *Biochim Biophys Acta*. In press.
27. Labbé S, Zhu Z, Thiele DJ (1997) Copper-specific transcriptional repression of yeast genes encoding critical components in the copper transport pathway. *J Biol Chem* 272: 15951-15958.
28. Beaudoin J, Labbé S (2006) Copper induces cytoplasmic retention of fission yeast transcription factor Cuf1. *Eukaryot Cell* 5: 277-292.
29. Jensen LT, Winge DR (1998) Identification of a copper-induced intramolecular interaction in the transcription factor Mac1 from *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J* 17: 5400-5408.
30. Zhu Z, Labbé S, Peña MMO, Thiele DJ (1998) Copper differentially regulates the activity and degradation of yeast Mac1 transcription factor. *J Biol Chem* 273: 1277-1280.
31. Beaudoin J, Mercier A, Langlois R, Labbé S (2003) The *Schizosaccharomyces pombe* Cuf1 is composed of functional modules from two distinct classes of copper metalloregulatory transcription factors. *J Biol Chem* 278: 14565-14577.
32. Bowen NJ, Jordan IK, Epstein JA, Wood V, Levin HL (2003) Retrotransposons and their recognition of pol II promoters: A comprehensive survey of the transposable elements from the complete genome sequence of *Schizosaccharomyces pombe*. *Genome Res* 13: 1984-1997.
33. Amorim MJ, Cotobal C, Duncan C, Mata J (2010) Global coordination of transcriptional control and mRNA decay during cellular differentiation. *Mol Syst Biol* 6: 380.

34. Nakamura T, Asakawa H, Nakase Y, Kashiwazaki J, Hiraoka Y, et al. (2008) Live observation of forespore membrane formation in fission yeast. *Mol Biol Cell* 19: 3544-3553.
35. Shigehisa A, Okuzaki D, Kasama T, Tohda H, Hirata A, et al. (2010) Mug28, a meiosis-specific protein of *Schizosaccharomyces pombe*, regulates spore wall formation. *Mol Biol Cell* 21: 1955-1967.
36. Ioannoni R, Beaudoin J, Mercier A, Labbé S (2010) Copper-dependent trafficking of the Ctr4-Ctr5 copper transporting complex. *PLoS One* 5: e11964.
37. Beaudoin J, Ioannoni R, Lopez-Maury L, Bähler J, Ait-Mohand S, et al. (2011) Mfc1 is a novel forespore membrane copper transporter in meiotic and sporulating cells. *J Biol Chem* 286: 34356-34372.
38. Beaudoin J, Labbé S (2007) Crm1-mediated nuclear export of the *Schizosaccharomyces pombe* transcription factor Cuf1 during a shift from low to high copper concentrations. *Eukaryot Cell* 6: 764-775.
39. Halliwell B, Gutteridge JM (1992) Biologically relevant metal ion-dependent hydroxyl radical generation. An update. *FEBS Lett* 307: 108-112.
40. Xie J, Pierce M, Gailus-Durner V, Wagner M, Winter E, et al. (1999) Sum1 and Hst1 repress middle sporulation-specific gene expression during mitosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J* 18: 6448-6454.
41. Pak J, Segall J (2002) Regulation of the premiddle and middle phases of expression of the NDT80 gene during sporulation of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 22: 6417-6429.

42. Klutstein M, Siegfried Z, Gispan A, Farkash-Amar S, Zinman G, et al. (2010) Combination of genomic approaches with functional genetic experiments reveals two modes of repression of yeast middle-phase meiosis genes. *BMC Genomics* 11: 478.
43. Lindgren A, Bungard D, Pierce M, Xie J, Vershon A, et al. (2000) The pachytene checkpoint in *Saccharomyces cerevisiae* requires the Sum1 transcriptional repressor. *EMBO J* 19: 6489-6497.
44. Sabatinos SA, Forsburg SL (2010) Molecular genetics of *Schizosaccharomyces pombe*. *Methods Enzymol* 470: 759-795.
45. Moreno S, Klar A, Nurse P (1991) Molecular genetic analysis of fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Methods Enzymol* 194: 795-823.
46. Wood V, Gwilliam R, Rajandream MA, Lyne M, Lyne R, et al. (2002) The genome sequence of *Schizosaccharomyces pombe*. *Nature* 415: 871-880.
47. Jbel M, Mercier A, Pelletier B, Beaudoin J, Labbé S (2009) Iron activates in vivo DNA binding of *Schizosaccharomyces pombe* transcription factor Fep1 through its amino-terminal region. *Eukaryot Cell* 8: 649-664.
48. Pelletier B, Beaudoin J, Mukai Y, Labbé S (2002) Fep1, an iron sensor regulating iron transporter gene expression in *Schizosaccharomyces pombe*. *J Biol Chem* 277: 22950-22958.
49. Keeney JB, Boeke JD (1994) Efficient targeted integration at leu1-32 and ura4-294 in *Schizosaccharomyces pombe*. *Genetics* 136: 849-856.
50. Chen D, Toone WM, Mata J, Lyne R, Burns G, et al. (2003) Global transcriptional responses of fission yeast to environmental stress. *Mol Biol Cell* 14: 214-229.

51. Mercier A, Watt S, Bähler J, Labbé S (2008) Key function for the CCAAT-binding factor Php4 to regulate gene expression in response to iron deficiency in fission yeast. *Eukaryot Cell* 7: 493-508.
52. Lyne R, Burns G, Mata J, Penkett CJ, Rustici G, et al. (2003) Whole-genome microarrays of fission yeast: Characteristics, accuracy, reproducibility, and processing of array data. *BMC Genomics* 4: 27.
53. Foiani M, Marini F, Gamba D, Lucchini G, Plevani P (1994) The B subunit of the DNA polymerase alpha-primase complex in *Saccharomyces cerevisiae* executes an essential function at the initial stage of DNA replication. *Mol Cell Biol* 14: 923-933.
54. Beaudoin J, Thiele DJ, Labbé S, Puig, S (2011) Dissection of the relative contribution of the *Schizosaccharomyces pombe* Ctr4 and Ctr5 proteins to the copper transport and cell surface delivery functions. *Microbiology*, 157: 1021-1031.

The abbreviations used are: bp, base pair(s); Cuf1, copper factor 1; Cuf2, copper factor 2; EMM, Edinburgh minimal medium; FSM, forespore membrane; GFP, green fluorescent protein; N, nitrogen; ORF, open reading frame; PCR, polymerase chain reaction; YES, yeast extract plus supplements; WT, wild-type.

Acknowledgments

We are grateful to Gilles Dupuis, Alexandre Mercier and William Home for critical reading of the manuscript and for their valuable comments. We thank Raymund Wellinger for the use of his micromanipulator in the tetrad dissections. We also thank Angélique Lanthier for her technical assistance.

ARTICLE 2

Cuf2 is a transcriptional co-regulator that interacts with Mei4 for timely expression of middle-phase meiotic genes

Auteurs de l'article :

Raphael Ioannoni, Ariane Brault et Simon Labbé.

Statut de l'article :

PLoS one. 2016, 11(3): e0151914. doi:10.1371.

Avant-propos :

Contributions et participation

Dans le cadre de ce manuscrit, j'ai réalisé plus de 90% du travail expérimental. Les outils moléculaires utilisés (souches et plasmides) ont été construits conjointement par RI (à 90%) et AB. Les figures ont été produites par RI. J'ai également participé activement à l'écriture du manuscrit.

Préambule

Élucidation du mécanisme par lequel Cuf2 régule l'expression de gènes méiotiques chez *S. pombe*.

Résumé de l'article :

Chez *Schizosaccharomyces pombe*, le gène *cuf2*⁺ code pour un régulateur qui participe à l'activation et à la répression de plusieurs gènes lors des divisions méiotiques. Dans cette étude, nous avons tenté de mieux comprendre le mécanisme par lequel Cuf2 régule l'expression génique lors du cycle méiotique. En utilisant une approche d'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP), nous démontrons que Cuf2 est spécifiquement associé au promoteur de ses gènes cibles dont il active (*fzr1*⁺) et réprime (*wtf13*⁺) l'expression au même moment lors de la progression du cycle méiotique. Nos résultats montrent que Cuf2 régule l'expression de ces deux gènes cibles selon un mécanisme de nature transcriptionnelle en influençant la présence de l'ARN polymérase II

(pol II) le long de leur région transcrite. De plus, on observe qu'en absence du facteur de transcription méiose-spécifique Mei4, Cuf2 n'est plus en mesure de réguler l'expression ni de *fzr1*⁺, ni de *wtf13*⁺. D'ailleurs, en absence de Mei4, nos résultats montrent que Cuf2 n'est plus en mesure de s'associer au promoteur de ses deux gènes cibles. En utilisant des essais de co-immunoprécipitation (CoIP), nos résultats montrent que Cuf2 et Mei4 sont présents au sein d'un même complexe protéique. Notamment, nos expériences de complémentation par fluorescence bimoléculaire (BiFC) indiquent que Cuf2 et Mei4 interagissent physiquement au niveau du noyau des cellules méiotiques. Des expériences de mutagenèse révèlent que le motif FLEX, soit le motif de liaison à l'ADN du facteur de transcription Mei4, est requis pour l'occupation de Cuf2 au niveau du promoteur de *fzr1*⁺. L'ensemble de nos données indiquent que Cuf2 et Mei4 interagissent afin de co-réguler l'expression de gènes méiose-spécifiques lors des divisions méiotiques.

Cuf2 is a transcriptional co-regulator that interacts with Mei4 for timely expression of middle-phase meiotic genes.

Raphaël Ioannoni, Ariane Brault, and Simon Labbé*.

Département de Biochimie, Faculté de médecine et des sciences de la santé, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, QC, J1E 4K8, Canada.

*Address correspondence to: Simon Labbé, Faculté de médecine Z-8, 3201, Jean Mignault, Sherbrooke (QC) J1E 4K8 Canada. Tel: (819) 821-8000 ext.: 75460;
E-mail: Simon.Labbe@USherbrooke.ca

Running title: Relationship between Cuf2 and Mei4 during middle meiosis.

Keywords: Meiosis, forkhead-type regulator, copper-fist-type regulator, FLEX elements, fission yeast.

Abstract

The *Schizosaccharomyces pombe* *cuf2*⁺ gene encodes a nuclear regulator that is required for timely activation and repression of several middle-phase genes during meiotic differentiation. In this study, we sought to gain insight into the mechanism by which Cuf2 regulates meiotic gene expression. Using a chromatin immunoprecipitation approach, we demonstrate that Cuf2 is specifically associated with promoters of both activated and repressed target genes, in a time-dependent manner. In case of the *fzr1*⁺ gene whose transcription is positively affected by Cuf2, promoter occupancy by Cuf2 results in a concomitant increased association of RNA polymerase II along its coding region. In marked contrast, association of RNA polymerase II with chromatin decreases when Cuf2 negatively regulates target gene expression such as *wtf13*⁺. Although Cuf2 operates through a transcriptional mechanism, it is unable to perform its function in the absence of the Mei4 transcription factor, which is a member of the conserved forkhead protein family. Using co-immunoprecipitation experiments, results showed that Cuf2 is a binding partner of Mei4. Bimolecular fluorescence complementation experiments brought further evidence that an association between Cuf2 and Mei4 occurs in the nucleus. Analysis of *fzr1*⁺ promoter regions revealed that two FLEX-like elements, which are bound by the transcription factor Mei4, are required for chromatin occupancy by Cuf2. Together, results reported here revealed that Cuf2 and Mei4 co-regulate the timely expression of middle-phase genes during meiosis.

Introduction

Meiosis is the cellular division process by which diploid precursor cells produce haploid gametes (Handel et Schimenti, 2010). In the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*, diploid cells are formed by conjugation of two haploid cells of opposite mating types (h^+/h^-) (Sabatinos et Forsburg, 2010). Following conjugation, the two haploid nuclei fuse and that subsequently induce premeiotic replication of chromosomal DNA. Chromosome duplication results in sets of homologous chromosomes that undergo pairing and recombination. Following this process, homologous chromosomes and sister chromatids are successively segregated during the first (MI) and second (MII) meiotic divisions, respectively. These divisions are followed by forespore membrane biogenesis and generation of four mature haploid spores that are enclosed into an ascus.

Diploid germ cells are present in a very small number in mammalian systems and that makes molecular research studies that rely on substantial sample volumes a formidable task (Kim *et al.*, 2010). Moreover, cells obtained from animal models (*e.g.* vitamin A-deficient mice) and tissue co-culture cells (*e.g.* Sertoli cells with germ cells) are very difficult to synchronize for their entry into meiosis. This inherent problem represents a major hurdle to investigate the molecular mechanisms that control initiation, progression, and termination of the meiotic program (Hogarth et Griswold, 2010, Staub, 2001). Over the last few decades, the use of model organisms has proved to be a rewarding avenue to understand meiotic highlights (Li *et al.*, 2010). In this connection, *Schizosaccharomyces pombe* has become a particularly attractive tool, mainly because the development of temperature-sensitive strains has made possible synchronization of cells prior to their entry into the meiotic program (Harigaya et Yamamoto, 2007, Mata *et al.*, 2002). For instance, a fission yeast strain harboring the *pat1-114* mutation produces a temperature-sensitive Pat1 kinase. When *pat1-114* cells undergo a transition from low (25°C) to elevated (34°C) temperature, the Pat1 kinase is readily inactivated and that triggers a cell cycle switch from mitosis to meiosis in a highly efficient and synchronous fashion (Bahler *et al.*, 1991, Doll *et al.*, 2008).

Initiation, progression and termination of meiosis are associated with marked changes in gene expression. In the case of fission yeast, transcriptional profiles of the meiotic cell cycle have defined four successive waves of gene expression that are mainly controlled by transcription factor cascades and feedback interactions between these regulators (Mata *et al.*, 2002, Mata *et al.*, 2007). First, in response to nutritional changes, Ste11 activates expression of pheromone- and starvation-responsive genes, which function in meiosis initiation and commitment. Subsequently, transcription of the nutrient-responsive genes is repressed by Rep1, which in turn activates expression of early-phase genes that are involved in premeiotic S-phase. After homologous recombination completed, Mei4 represses the expression of early-phase genes while it activates transcription of middle-phase genes, which carry out meiotic nuclear divisions and early steps of spore formation (Abe et Shimoda, 2000). Fine mapping analysis of several promoter regions of genes under the control of Mei4 have identified a consensus *cis*-acting element, denoted FLEX, which contains a heptamer core (G/A)TAAA(C/T)A to which Mei4 binds (Abe et Shimoda, 2000, Horie *et al.*, 1998). Furthermore, a AACA 3' flanking sequence is often found immediately downstream of the FLEX core sequence (Abe et Shimoda, 2000). Finally, late-phase genes are responsible for spore maturation and are essentially activated through a combination of different transcription factors, including Rev2, Atf21 and Atf31 (Mata *et al.*, 2002, Mata *et al.*, 2007).

In addition to these major meiotic activators, other regulators have pivotal roles in regulating meiotic gene expression. During middle-phase meiosis, Mei4 induces the expression of *cuf2*⁺, which encodes for a copper fist-like nuclear regulator that is exclusively expressed during meiosis (Ioannoni *et al.*, 2012, Mata *et al.*, 2007). Within its N-terminal portion, Cuf2 possesses a putative Zn²⁺-coordinating module that in copper-sensing transcription factors makes contact with DNA minor groove (Koch et Thiele, 1996, Winge, 1998). Despite this structural feature, experiments undertaken to establish a role for Cuf2 in the regulation of copper homeostasis were inconclusive (Ioannoni *et al.*, 2012). However, it was shown that cells lacking Cuf2 exhibited an elevated and sustained expression of several middle-phase genes (e.g. *wtf13*⁺) that persisted even during late meiosis (Ioannoni *et al.*, 2012). Results showed that the absence of Cuf2 triggers errors

that jeopardize the quality and quantity of haploid gametes, which leads to a dramatic reduction of spore viability (Ioannoni *et al.*, 2012). Thus far, however, the molecular mechanism by which Cuf2 represses expression of middle-phase meiotic genes remains unknown.

As a specialized form of cell division, meiosis undergoes through additional layers of regulation. Ubiquitin-mediated proteolysis is involved in meiotic cell-cycle control as one of the post-translational regulatory mechanisms (Kimata *et al.*, 2011). One of the major E3 ubiquitin ligase that is responsible for timely degradation of cell cycle-regulatory cyclins during the meiotic program is the anaphase-promoting complex/cyclosome (APC/C) (Pesin *et al.*, 2008). The APC/C activity is exquisitely regulated during meiosis (Kimata *et al.*, 2011). One of the factor of APC/C regulation is the Fizzy-related protein Fzr1 (also denoted Mfr1), which recognizes and recruits target substrates via its C-terminal WD40 repeat domain (Asakawa *et al.*, 2001, Blanco *et al.*, 2001, Yu, 2007). Following Fzr1-mediated substrate recruitment in meiosis II, the APC/C complex becomes fully active and triggers rapid degradation of the Cdc13 cyclin at the end of meiosis II, thus ensuring termination of the meiotic division cycle. Although Mei4 up-regulates *fzr1*⁺ expression in middle meiosis, recent studies have shown that Cuf2 further enhances its (*fzr1*⁺) transcription to ensure timely proteolysis of Cdc13 (Aoi *et al.*, 2013, Mata *et al.*, 2007). Analogous to *fzr1* Δ/Δ cells, a proportion of ~20% of *cuf2* Δ/Δ mutant cells fail to terminate meiosis II and enter into an aberrant third nuclear division, producing aberrant number of nuclei in several asci (Aoi *et al.*, 2013). Although it was shown that Cuf2 directly enhances *fzr1*⁺ expression through promoter occupancy, the molecular mechanism by which Cuf2 associates with chromatin has not yet been ascertained.

Because of the critical role of Cuf2 during meiosis, we designed a series of experiments to gain further insight into the mechanism by which Cuf2 affects gene expression. Here, we report that a functional Cuf2-TAP occupies *fzr1*⁺ and *wtf13*⁺ promoters *in vivo*. Furthermore, results of ChIP experiments showed that Cuf2 occupies specific regions in the promoter of both target genes and operates through a transcriptional mechanism to either promote or prevent RNA polymerase II occupancy along *fzr1*⁺ and *wtf13*⁺ transcribed regions. Mei4 was found to be required for Cuf2 function in target gene regulation and its

ability to associate with *fzr1*⁺ and *wtf13*⁺ promoters *in vivo*. Further analysis by coimmunoprecipitation and bimolecular fluorescence complementation assays revealed that Cuf2 is a binding partner of Mei4. We found that two DNA binding sites for Mei4 are required for transcriptional regulation of *fzr1*⁺ by Cuf2. Taken together, these results suggested that in the presence of Mei4, Cuf2 acts as a co-regulator for transcriptional control of middle-phase meiotic genes.

Materials and Methods

Yeast strains and growth conditions. Genotypes of *S. pombe* strains used in this study are described in Table 1. Standard methods were used for growth, sexual conjugation and sporulation of cells (Sabatinos et Forsburg, 2010). Untransformed strains were cultured on yeast extract medium (YES) that was supplemented with 225 mg/L of adenine, histidine, leucine, uracil and lysine. Cells transformed with gene-swap knock-in cassettes were selected on YES medium supplemented with the geneticin antibiotic (G418, 200 µg/ml) (Sigma-Aldrich). When plasmid integration was required, cells were cultured in Edinburgh minimal medium (EMM) lacking the specific nutrients to select cells expressing integrative vectors. $h^+/h^+ pat1-114/pat1-114$ and $h^+/h^+ pat1-114/pat1-114 cuf2\Delta/cuf2\Delta$ diploid strains were obtained by incubating mid-logarithmic phase cultures of haploid cells with 20 µg/ml carbendazim (Sigma-Aldrich) as described previously (Zhang *et al.*, 2013). Preparation and synchronization of *pat1-114/pat1-114* diploid cells for their entry into meiosis was performed as described previously (Ioannoni *et al.*, 2012). In the cases of Western blot, chromatin immunoprecipitation (ChIP) and co-immunoprecipitation (CoIP) experiments, phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF, 1 mM, Roche) was added directly to the cell cultures 15 min before harvesting to protect proteins from proteolysis.

Table 1. *S. pombe* strains used in this study.

Strain	Genotype	Source
FY435	$h^+ his7-366 leu1-32 ura4-\Delta18 ade6-M210$	(14)
RAY1	$h^+ his7-366 leu1-32 ura4-\Delta18 ade6-M210 cuf2\Delta::KAN^r$	(14)
RAY29	$h^+ his7-366 leu1-32 ura4-\Delta18 ade6-M210 cuf2\Delta::loxP mei4\Delta::KAN^r$	This study
RAY30	$h^+ his7-366 leu1-32 ura4-\Delta18 ade6-M210 cuf2\Delta::loxP mei4\Delta::KAN^r$ $nmt1(3X)-mei4^+-GFP::ade6^+, cuf2^+::leu1^+$	This study
RAY31	$h^+ his7-366 leu1-32 ura4-\Delta18 ade6-M210 cuf2\Delta::loxP mei4\Delta::KAN^r$ $nmt1(3X)-mei4^+-GFP::ade6^+, cuf2^+-TAP::leu1^+$	This study

RAY32	<i>h⁺ his7-366 leu1-32 ura4-Δ18 ade6-M210 cuf2Δ::loxP mei4Δ::KAN^r nmt1(3X)-mei4⁺-GFP::ade6⁺, TAP alone::leu1⁺</i>	This study
RAY33	<i>h⁺ his7-366 leu1-32 ura4-Δ18 ade6-M210 cuf2Δ::loxP mei4Δ::KAN^r nmt1(3X)-mei4⁺-VC::ade6⁺, cuf2⁺-VN::leu1⁺</i>	This study
RAY34	<i>h⁺ his7-366 leu1-32 ura4-Δ18 ade6-M210 cuf2Δ::loxP mei4Δ::KAN^r nmt1(3X)-mei4⁺-VC::ade6⁺, VN-fep1⁺::leu1⁺</i>	This study
JB484	<i>h⁺ pat1-114 ade6-M210</i>	(14)
RAY12	<i>h⁺ pat1-114 ade6-M210 cuf2Δ::KAN^r</i>	(14)
RAY16	<i>h⁺ pat1-114 ade6-M210 cuf2Δ::KAN^r cuf2⁺::ade6⁺</i>	(14)
RAY17	<i>h⁺ pat1-114 ade6-M210 cuf2Δ::KAN^r cuf2⁺-TAP::ade6⁺</i>	(14)
RAY35	<i>h⁺ pat1-114 ade6-M210 cuf2Δ::KAN^r nmt1(3X)cuf2⁺::ade6⁺</i>	This study
RAY36	<i>h⁺ pat1-114 ade6-M210 cuf2Δ::KAN^r nmt1(3X)cuf2⁺-TAP::ade6⁺</i>	This study
RAY14	<i>h⁺ pat1-114 ade6-M210 mei4Δ::KAN^r</i>	(14)
RAY37	<i>h⁺ pat1-114 ade6-M210 mei4Δ::KAN^r mei4⁺::ade6⁺</i>	This study
RAY38	<i>h⁺ pat1-114 ade6-M210 mei4Δ::loxP mei4⁺-TAP::ade6⁺</i>	This study
RAY39	<i>h⁺ pat1-114 ade6-M210 cuf2Δ::loxP mei4Δ::KAN^r</i>	This study
RAY40	<i>h⁺ pat1-114 ade6-M210 cuf2Δ::loxP mei4Δ::KAN^r cuf2⁺-TAP::ade6⁺</i>	This study
RAY41	<i>h⁺ pat1-114 ade6-M210 cuf2Δ::loxP mei4Δ::KAN^r nmt1(3X)cuf2⁺-TAP::ade6⁺</i>	This study
RAY42	<i>h⁺ pat1-114 ade6-M210 cuf2Δ::loxP mei4Δ::loxP cuf2⁺-TAP::ade6⁺ -370fzr1⁺::KAN^r</i>	This study

RAY43	$h^+ pat1-114 ade6-M210 cuf2\Delta::loxP mei4\Delta::loxP cuf2^+-TAP::ade6^+$ $-370FLEX(1-2)\Delta\Delta fzl^+::KAN^r$	This study
RAY44	$h^+ pat1-114 ade6-M210 cuf2\Delta::loxP mei4\Delta::loxP cuf2^+-TAP::ade6^+$ $-156fzl^+::KAN^r$	This study
RAY45	$h^+ pat1-114 ade6-M210 mei4\Delta::loxP mei4^+-TAP::ade6^+$ $-370fzl^+::KAN^r$	This study
RAY46	$h^+ pat1-114 ade6-M210 mei4\Delta::loxP mei4^+-TAP::ade6^+$ $-370 FLEX(1-2)\Delta\Delta fzl^+::KAN^r$	This study
RAY47	$h^+ pat1-114 ade6-M210 mei4\Delta::loxP mei4^+-TAP::ade6^+$ $-156fzl^+::KAN^r$	This study

Ectopic Mei4-driven meiosis. The thiamine-repressible *nmt1*⁺ promoter (from pREP3X or pREP41X) (Forsburg, 1993) was cloned immediately upstream of the *mei4*⁺ gene. Activation of *nmt1*⁺ fostered production of Mei4 in vegetative cells. Several middle-phase meiotic genes were ectopically expressed in vegetative cells following Mei4 induction, as described previously (Amorim *et al.*, 2010, Mata *et al.*, 2007, Nakase *et al.*, 2009). Cells expressing an integrated *nmt1*⁺ 3X or 41X *mei4*⁺-GFP or -VC allele were grown in the presence of 5 μ M thiamine. At mid-logarithmic phase, cells were washed twice and incubated for 16, 18 and 20 h in thiamine-free media. At these time points, cells were harvested to carry out various analysis, including RNase protection, ChIP and BiFC assays.

cuf2⁺ and *mei4*⁺ plasmids. The intron-less DNA segment corresponding to *cuf2*⁺ cDNA was generated by a strategy described previously (Ioannoni *et al.*, 2012). pBP-500*cuf2*⁺, pBP-500*cuf2*⁺-TAP, pJK-500*cuf2*⁺ and pJK-500*cuf2*⁺-TAP plasmids have been described previously (Ioannoni *et al.*, 2012). PCR amplification of the *mei4*⁺ gene was performed using primers designed to generate PstI and XmaI restriction sites at the upstream and downstream termini of the open reading frame, respectively. The PCR product was

digested with PstI and XmaI and swapped for the equivalent DNA restriction fragment in pBP-500*cuf2*⁺-TAP to generate pBP-500*mei4*⁺-TAP. Subsequently, the *cuf2*⁺ promoter was replaced with the *mei4*⁺ promoter (regulatory region up to position -500 from the initiator codon) using the ApaI and PstI sites. The resulting construct allowed expression of a TAP-tagged Mei4 protein under the control of its own promoter in meiotic cells. DNA fragments corresponding to *nmt1*⁺ 3X and 41X promoters were isolated from pSP1*nmt1*⁺3X-*cuf1*⁺-GFP and pSP1*nmt1*⁺41X-*cuf1*⁺-GFP (Beaudoin et Labbe, 2007) using ApaI and PstI restriction enzymes. Purified fragments were inserted into pBP-500*cuf2*⁺, pBP-500*cuf2*⁺-TAP, and pBP-500*mei4*⁺-TAP from which the ApaI-PstI *cuf2*⁺ or *mei4*⁺ promoter fragment had previously been removed. The resulting plasmids were denoted pBP*nmt1*⁺3X-*cuf2*⁺, pBP*nmt1*⁺3X-*cuf2*⁺-TAP, pBP*nmt1*⁺3X-*mei4*⁺-TAP, pBP*nmt1*⁺41X-*cuf2*⁺, pBP*nmt1*⁺41X-*cuf2*⁺-TAP, and pBP*nmt1*⁺41X-*mei4*⁺-TAP. Plasmids pBP*nmt1*⁺3X-*mei4*⁺-TAP and pBP*nmt1*⁺41X-*mei4*⁺-TAP were digested with XmaI and SacI to remove their TAP coding sequences. A XmaI-SacI PCR-amplified fragment containing the coding region of GFP was then inserted in-frame to the 3' terminal region of *mei4*⁺ to generate plasmids pBP*nmt1*⁺3X-*mei4*⁺-GFP and pBP*nmt1*⁺41X-*mei4*⁺-GFP. Coding regions of Venus N-terminal (VN) and C-terminal (VC) fragments were amplified by PCR from pSP1*ctr5*⁺-VN and pBP*ctr4*⁺-VC (Ioannoni *et al.*, 2010) using primers that added unique XmaI and SacI restriction sites. Subsequently, purified XmaI-SacI DNA fragments (from VN or VC) were exchanged with the XmaI-SacI DNA regions in plasmids pJK-500*cuf2*⁺-TAP and pBP*nmt1*⁺3X (or 41X)-*mei4*⁺-TAP to generate pJK-500*cuf2*⁺-VN and pBP*nmt1*⁺3X (or 41X)-*mei4*⁺-VC, respectively. Plasmid pJKVN-*fep1*⁺, which was used as a control of interaction specificity, has been described previously (Jacques *et al.*, 2014). The TAP coding sequence was amplified by PCR using primers that added XmaI and SacI unique restriction sites. The resulting DNA fragment was inserted into pJK-500*cuf2*⁺-TAP from which the *cuf2*⁺-TAP fragment had been removed using the XmaI-SacI restriction sites to generate the pJK-500TAP alone, which was used as a control in CoIP experiments.

Mutated elements in the promoter region of fzf1⁺. We engineered strains in which two FLEX elements were mutated in the promoter region of *fzf1*⁺. First, a *fzf1*⁺ promoter region encompassing positions -810 to -661 (with respect to A of the ATG codon of *fzf1*⁺)

was amplified by PCR and then inserted into pKSloxP-KAN-loxP at the NotI and EcoRI sites. This plasmid was designated pKS*fzrI*⁻⁸¹⁰⁻⁶⁶¹loxP-KAN-loxP. Second, a 1355-bp SalI-Asp718 fragment from the *fzrI*⁺ locus (starting at -370 before the start codon up to +985) was amplified and cloned into the same sites of pKS*fzrI*⁻⁸¹⁰⁻⁶⁶¹loxP-KAN-loxP. The resulting plasmid was named pKS*fzrI*⁻⁸¹⁰⁻⁶⁶¹loxP-KAN-loxP*fzrI*⁻³⁷⁰⁻⁺⁹⁸⁵. The *fzrI*⁺ promoter region (positions -370 to -1) contained two FLEX sequences (positions -295 to -288 and -208 to -198). These two FLEX elements were either left unchanged (wild-type) or mutated using a PCR overlap extension method (Ho *et al.*, 1989). The plasmid containing mutated FLEX sequences was denoted pKS*fzrI*⁻⁸¹⁰⁻⁶⁶¹loxP-KAN-loxP*fzrI*⁻³⁷⁰⁻⁺⁹⁸⁵FLEX 1-2 mut. The two plasmids, pKS*fzrI*⁻⁸¹⁰⁻⁶⁶¹loxP-KAN-loxP*fzrI*⁻³⁷⁰⁻⁺⁹⁸⁵ and pKS*fzrI*⁻⁸¹⁰⁻⁶⁶¹loxP-KAN-loxP*fzrI*⁻³⁷⁰⁻⁺⁹⁸⁵FLEX 1-2 mut, were subsequently digested with NotI and Asp718 (for which the restriction sites are unique and found at positions -810 and +985, respectively) to produce a DNA fragment that allowed homologous integration of wild-type or mutated FLEX elements at the chromosomal locus of *fzrI*⁺, thereby generating a FLEX-containing or FLEX-less *fzrI*⁺ promoter.

RNA isolation and analysis. Total RNA was extracted using a standard hot phenol method (Chen *et al.*, 2003). Gene expression profiles were analyzed using RNase protection assays as described previously (Mercier *et al.*, 2008). Plasmids pSK*fzrI*⁺, pSK*wtf13*⁺, pSK*mei4*⁺ and pSK*act1*⁺ were used to produce antisense RNA probes that served to determine *fzrI*⁺, *wtf13*⁺, *mei4*⁺, and *act1*⁺ mRNA levels, respectively. A short coding sequence was amplified by PCR in the case of each gene (Table 2). Primers were designed to generate BamHI and EcoRI sites at the ends of the amplified fragments. Each of these DNA fragments was digested with BamHI and EcoRI and cloned into the same restriction sites of pBluescript SK (Stratagene). ³²P-labeled anti-sense RNA probes were generated using BamHI-linearized plasmids (pSK*fzrI*⁺, pSK*wtf13*⁺, pSK*mei4*⁺ and pSK*act1*⁺), [α -³²P]UTP and T7 RNA polymerase as described previously (Mercier *et al.*, 2008). Riboprobe length and hybridization positions relative to the A of the initiator codon of each gene are listed in Table 2. *act1*⁺ mRNA was probed as an internal control for normalization during quantification of the RNase protection products.

Table 2. Riboprobes used to detect steady-state levels of transcripts.

Gene ID	Gene name	Riboprobe length (bp)	Position relative to initiator codon	Source or reference
<i>SPBC1198.12</i>	<i>fzr1⁺/mfr1⁺</i>	199	+115 to +314	This study
<i>SPBC32H8.11</i>	<i>mei4⁺</i>	200	+171 to +371	(14)
<i>SPCC162.04c</i>	<i>wtfl3⁺</i>	177	+374 to +551	This study
<i>SPBC32H8.12c</i>	<i>act1⁺</i>	151	+334 to +485	(14)

Protein extraction and analysis. To determine the steady-state protein levels of Cuf2-TAP and α -tubulin, whole cell extracts were prepared using a trichloroacetic acid (TCA) extraction method (Foiani *et al.*, 1994). Equal amounts of each sample preparation were resuspended in sodium dodecyl sulfate loading buffer and proteins were resolved by electrophoresis on 8-% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels. Proteins were then electroblotted onto nitrocellulose membranes for 1 h at 4°C. Membranes were blocked by treatment (2 h, at 4°C) with 5% powdered skim milk (Difco) in TBS (10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% bovine serum albumin) containing 0.1% Tween 20 (TBST). Following washings with TBST, membranes were incubated with primary antibodies in 1% powdered skim milk in TBST for 16 h at 4°C. The following antibodies were used for immunodetection of Cuf2-TAP and α -tubulin: polyclonal anti-mouse IgG antibody (ICN Biomedicals) and monoclonal anti- α -tubulin antibody (clone B-5-1-2; Sigma-Aldrich), respectively. Following incubation, the membranes were washed and incubated with the appropriate horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies (Amersham Biosciences), developed with enhanced chemiluminescence (ECL) reagents (Amersham Biosciences), and visualized by chemiluminescence using an ImageQuant LAS 4000

instrument (GE Healthcare) equipped with a Fujifilm High Sensitivity F0.85 43 mm camera.

ChIP experiments. *In vivo* chemical cross-linking of proteins was performed by incubating cell cultures in the presence of 1% formaldehyde for 20 min. After formaldehyde-mediated cross-links and neutralization with glycine, cell lysates were prepared by glass bead disruption in lysis buffer containing 100 mM HEPES-KOH pH 7.5, 1% Triton X-100, 0.1% Na-deoxycholate, 1 mM EDTA, 140 mM NaCl, 2X cOmplete ULTRA Tablets (protease inhibitors, Roche), 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 50 mM NaF and 0.2 mM Na₃VO₄, as described previously (Larochelle *et al.*, 2012). Samples were subsequently sonicated 10 times (10 s cycles at 20 amplitude microns [20%]) using a Branson 450 sonicator in order to shear chromatin DNA into fragments of ~500 to 1000 bp. Immunoprecipitation of Cuf2-TAP and Mei4-TAP proteins bound to chromatin was performed using immunoglobulin G (IgG)-Sepharose beads. In the case of the RNA polymerase II, immunoprecipitation was carried out using protein G sepharose beads that were coupled to a monoclonal anti-Rpb1 antibody (clone 8WG16, Covance), which specifically recognizes a repeated seven-residue motif (YSPTSTS) located at the C-terminus of Rpb1, termed the C-terminal domain (CTD). Manipulation of beads, including washings and elution, reversed cross-linking, and DNA precipitation were performed as described previously (Adam *et al.*, 2001, Jbel *et al.*, 2009). Quantification of immunoprecipitated DNA was carried out by real-time PCR (qPCR) using different sets of primers that spanned *fzr1*⁺, *wtf13*⁺, and *mei4*⁺ promoter regions. Cuf2-TAP, Mei4-TAP or RNA polymerase II density at *fzr1*⁺, *wtf13*⁺, and *mei4*⁺ promoters was calculated as the enrichment of specific genomic *fzr1*⁺, *wtf13*⁺, and *mei4*⁺ promoter regions relative to a 18S ribosomal DNA coding region. Primers that were used for qPCR analysis are listed in Table 3. Each qPCR was run in triplicate using Perfecta SYBR Green Fast mix (Quanta) on a LightCycler 96 Real-Time PCR instrument (Roche). All ChIP experiments were repeated at least three times using independent chromatin preparations.

Table 3. Primers used for qPCR analyses in ChIP experiments.

Gene name	Primer set	Position relative to initiator codon	Amplicon length (bp)	Source
<i>fzr1⁺/mfr1⁺</i>	A	-1032/-896	137	This study
	B	-649/-505	145	This study
	C	-398/-290	109	This study
	D	-130/-31	100	This study
	ORF A	278/416	139	This study
	ORF B	765/890	110	This study
	ORF C	1038/1187	126	This study
	3'-UTR A	+112/+210	99	This study
<i>wtf13⁺</i>	A	-1047/-903	145	This study
	B	-652/-575	78	This study
	C	-400/-250	151	This study
	D	-184/-88	97	This study
	ORF A	278/416	139	This study
	ORF B	1440/1547	108	This study
	3'-UTR A	+528/+632	105	This study
<i>mei4⁺</i>	A	-899/-747	153	This study
	B	-570/-445	126	This study
	C	-222/-124	99	This study
	ORF A	16/148	133	This study
	ORF B	1082/1203	122	This study

Co-immunoprecipitation experiments. To determine whether Cuf2 interacted with Mei4 in *S. pombe*, *cuf2Δ mei4Δ* cells were co-transformed with pBPnmt1⁺-*mei4⁺*-GFP and pJK-500*cuf2⁺*-TAP; pBPnmt1⁺-*mei4⁺*-GFP and pJK-500*cuf2⁺* or, pBPnmt1⁺-*mei4⁺*-GFP and pJK-500TAP alone. Mid-logarithmic cell cultures were grown in thiamine-free medium to induce mitotic expression of Mei4, therefore fostering artificial expression of middle-phase

meiotic genes in vegetative cells. Total cell lysates were obtained by glass bead disruption in lysis buffer (10 mM Tris-HCl (pH 7.9), 0.1% Triton X-100, 0.5 mM EDTA, 20% glycerol, 100 mM NaCl, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 50 mM NaF and 0.2 mM Na_3VO_4) containing a mixture of 2X protease inhibitors (cOmplete ULTRA Tablets, Roche). The mixture was centrifuged (13,000 rpm) and equal amounts of proteins (10 mg) were added to 25- μl bed volumes of IgG Sepharose 6 Fast-Flow beads (GE Healthcare) and the suspensions were mixed by inversion for 2 h at 4°C. The beads were washed three times with 1 ml of lysis buffer and then transferred to fresh microtubes prior to a final wash. The immunoprecipitates were resuspended in 120 μl of sodium dodecyl sulfate loading buffer and proteins resolved by electrophoresis on 8% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels. The following antibodies were used: polyclonal anti-mouse IgG antibody (ICN Biomedicals), polyclonal anti-GFP antibody (clone FL; Santa Cruz Biotechnology) and monoclonal anti- α -tubulin antibody (clone B-5-1-2; Sigma-Aldrich) in Western blot analysis of Cuf2-TAP, TAP alone, Mei4-GFP, and α -tubulin. Membranes were developed using Amersham ECL Prime Western blotting detection reagent (GE Healthcare).

Bimolecular fluorescence complementation (BiFC) analysis. *cuf2 Δ mei4 Δ* or *fep1 Δ mei4 Δ* double mutant cells co-expressing Mei4-VC and Cuf2-VN or Mei4-VC and VN-Fep1 fusion proteins were grown to mid-log phase in EMM containing 5 μM thiamine. Cells were then washed twice, diluted to an A_{600} of ~ 0.03 in EMM without thiamine, and then cultured for 18 h. After Mei4 induction and artificial expression of middle-phase meiotic genes in vegetative cells, fluorescence and differential interference contrast images were viewed using an Eclipse E800 epifluorescent microscope (Nikon, Melville, NY) equipped with an ORCA ER digital cooled camera (Hamamatsu, Bridgewater, NJ). BiFC signals were visualized using a magnification of X1,000 with a transmission window of 465 to 495 nm, whereas chromosomal material (stained with Hoechst 33342 dye) was detected with a window of 340 to 380 nm. Cell fields shown in this study represent a minimum of five independent experiments. The merged images were obtained using the Simple PCI software, version 5.3.0.1102 (Compix, Sewickly, PA).

Results

Cuf2 is required for the timely expression of $fzr1^+$ and $wtf13^+$ during meiosis. In a previous study, we used a genome-wide DNA microarray approach and found that 9 h after meiotic induction, a total of 545 genes were differentially expressed in cells lacking Cuf2 (*cuf2 Δ /cuf2 Δ*) compared to control cells expressing Cuf2 (*cuf2 $^+$ /cuf2 $^+$*) (Ioannoni *et al.*, 2012). Among these genes, 247 were expressed at higher levels in *cuf2 Δ /cuf2 Δ* mutant cells, including 144 genes that were annotated as meiosis-specific middle genes. Comprehensive expression profile analyses of 4 middle-phase meiotic genes, including *wtf13 $^+$* , established that Cuf2 was required for gene repression at the onset of late meiosis (Ioannoni *et al.*, 2012). More recently, Yamamoto's group has uncovered from a genetic screen that the meiotic fizzy-related gene 1, denoted *fzr1 $^+$ /mfr1 $^+$* , was a critical target gene of Cuf2 (Aoi *et al.*, 2013). During the transition phase from meiotic division I to II, Cuf2 enhances *fzr1 $^+$* gene expression, thereby producing sufficient quantities of Fzr1 protein that is necessary to terminate the meiotic division cycle (Aoi *et al.*, 2013). Since our previous DNA microarray experiments were performed only after completion of the meiotic divisions, our results did not highlight the effect of *cuf2 Δ /cuf2 Δ* deletion on the expression of *fzr1 $^+$* . To validate that indeed, Cuf2 activates *fzr1 $^+$* transcription while it also acts as a negative regulator for the expression of other middle-phase genes, RNase protection assays were performed to measure steady-state transcript levels of *fzr1 $^+$* and *wtf13 $^+$* in wild-type versus *cuf2 Δ /cuf2 Δ* cells. Synchronization of wild-type and *cuf2 Δ /cuf2 Δ* cells was verified by probing mRNA levels of *mei4 $^+$* . Furthermore, expression of *mei4 $^+$* was tested as a control of a middle meiotic gene that is not regulated by Cuf2 (Ioannoni *et al.*, 2012). Diploid *pat1-114/pat1-114 cuf2 $^+$ /cuf2 $^+$* and *pat1-114/pat1-114 cuf2 Δ /cuf2 Δ* cells were induced to undergo synchronous meiosis and total RNA was subsequently isolated from culture aliquots taken at different time points. In the case of *cuf2 $^+$ /cuf2 $^+$* cells, results showed that *fzr1 $^+$* mRNAs were absent in early meiosis but reached maximum levels after 6 h of meiotic induction (Fig. 1A and unpublished data). This peak of gene expression was followed by a ~2.5-fold reduction of *fzr1 $^+$* mRNA levels that occurred 7 h after meiotic induction. *fzr1 $^+$* transcript levels were subsequently repressed within 8 – 9 h (Fig. 1A). In the case of *cuf2 Δ /cuf2 Δ* cells, *fzr1 $^+$* transcript levels were detected after 6 h of meiotic induction but to a lesser extent (~40% less) in comparison with transcript levels observed in

cuf2⁺/cuf2⁺ cells (Fig. 1A). In mutant cells, *fzr1⁺* mRNA levels remained elevated and nearly unchanged after 7 h of the meiotic program. Weak *fzr1⁺* mRNA levels were only observed after 8 h of meiotic induction (Fig. 1A). Expression of *wtf13⁺* was also analyzed as a function of time during meiosis (Fig. 1B). At the 5-h time point, RNase protection experiments revealed that the expression levels of *wtf13⁺* were increased in a similar manner in both *cuf2⁺/cuf2⁺* and *cuf2Δ/cuf2Δ* cells. However, *wtf13⁺* mRNA levels were ~1.5- and ~2.6-fold higher in *cuf2Δ/cuf2Δ* cells as compared to those in control cells after 8 and 9 h of meiotic induction, respectively (Fig. 1B). These results confirmed that expression of *wtf13⁺* was up-regulated and remained at high steady-state levels even during late meiosis (in *cuf2Δ/cuf2Δ*) when its expression normally was reduced (in *cuf2⁺/cuf2⁺*). In the case of mRNA steady-state levels of *mei4⁺*, the *cuf2Δ/cuf2Δ* mutant did not show any significant effect on the expression of *mei4⁺* as a function of time in meiosis (Fig. 1C). Taken together, these results showed that Cuf2 functions in the timely activation and repression of *fzr1⁺* and *wtf13⁺*, respectively, therefore ensuring the adequate abundance of transcripts at the correct times during meiosis.

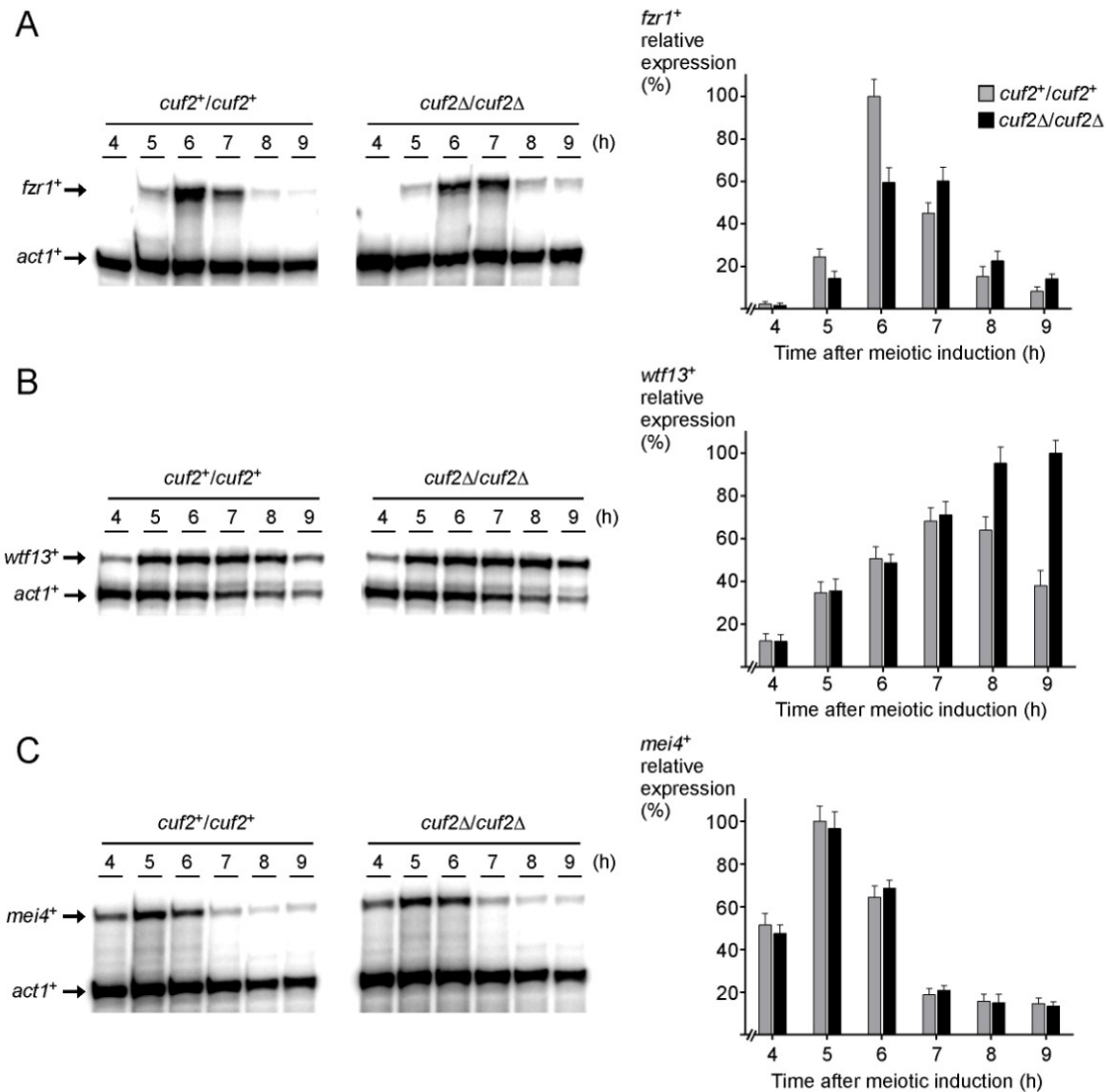


Fig. 1. *Cuf2* coordinates timely expression of *fzf1*⁺ and *wtf13*⁺ during meiosis. Cultures of *pat1-114/pat1-114 cuf2*⁺/*cuf2*⁺ and *pat1-114/pat1-114 cuf2*Δ/*cuf2*Δ cells were induced to initiate and proceed through meiosis. At the indicated times after meiotic induction, *fzf1*⁺ (panel A), *wtf13*⁺ (panel B), and *mei4*⁺ (panel C) mRNA levels were analyzed by RNase protection assays. For each panel, graphic representation of quantification of the results of three independent RNase protection assays is depicted, including the experiment shown on left side. Values indicate the normalized *fzf1*⁺, *wtf13*⁺, and *mei4*⁺ transcript levels relative to *act1*⁺ mRNA levels. Histogram values are shown as averages ± S.D.

Cuf2 associates with *fzf1*⁺ and *wtf13*⁺ promoters *in vivo*. Although it has been shown that *Cuf2* activates transcription of *fzf1*⁺ through its association with the *fzf1*⁺ promoter *in vivo* (Aoi *et al.*, 2013), promoter occupancy by *Cuf2* as a function of time remains uncharacterized. Moreover, it remains unclear whether *Cuf2* directly represses middle-

phase meiotic genes (e.g. *wtf13*⁺). To gain insight into these aspects, *pat1-114/pat1-114 cuf2Δ/cuf2Δ* cells expressing either an untagged or a functional TAP-tagged version of Cuf2 under the control of its own promoter were synchronized to initiate and to proceed through meiosis. Each hour over a time period of 4 to 8 h after meiotic induction, cells were either fixed by formaldehyde treatment for ChIP assays or harvested and lysed to analyze steady-state levels of Cuf2-TAP. Results showed that Cuf2-TAP was first detected after 5 h of meiotic induction (Fig. 2A). At this time point (5h) and after 6 and 7 h of meiotic induction, Cuf2-TAP protein levels were elevated. In contrast, at the 8-h time point, results showed that levels of Cuf2-TAP were significantly reduced compared with levels observed after 5 h of meiotic induction. Results from ChIP analysis showed that Cuf2-TAP occupied *fzr1*⁺ and *wtf13*⁺ promoters at maximum levels 6 h after meiotic induction (Fig. 2, B and C). At this 6-h time point, Cuf2-TAP exhibited 5.0- and 3.8-fold increases in its binding to *fzr1*⁺ and *wtf13*⁺ promoters, respectively (Fig. 2B and C). Values obtained were expressed as fold enrichment relative to a control 18S ribosomal DNA coding region that did not exhibit any transcriptional variation as a function of Cuf2 availability. In the case of the association of Cuf2-TAP with the *fzr1*⁺ promoter, its level of occupancy was 52%, 16% and 58% lower after 5, 7 and 8 h of meiotic induction, respectively, compared with level observed after 6 h of meiotic induction (Fig. 2B). Similarly, Cuf2-TAP exhibited a reduced ability to bind *wtf13*⁺ promoter after 5 h (52% lower), 7 h (24% lower) and 8 h (58% lower) of meiotic induction as compared with the 6-h time point (Fig. 2C). Results from ChIP analysis showed that Cuf2-TAP did not associate with the *mei4*⁺ promoter. Only very weak levels of *mei4*⁺ promoter fragments were immunoprecipitated (Fig. 2D). These low levels of immunoprecipitated chromatin were similar to the background signals observed when ChIP assays were performed in *cuf2Δ/cuf2Δ* cells expressing untagged *cuf2*⁺, which had been re-integrated (Fig. 2, B – D). Taken together, these results suggested that *fzr1*⁺ and *wtf13*⁺ promoters are occupied by Cuf2 in a time-dependent manner, mostly during the middle-phase of meiosis.

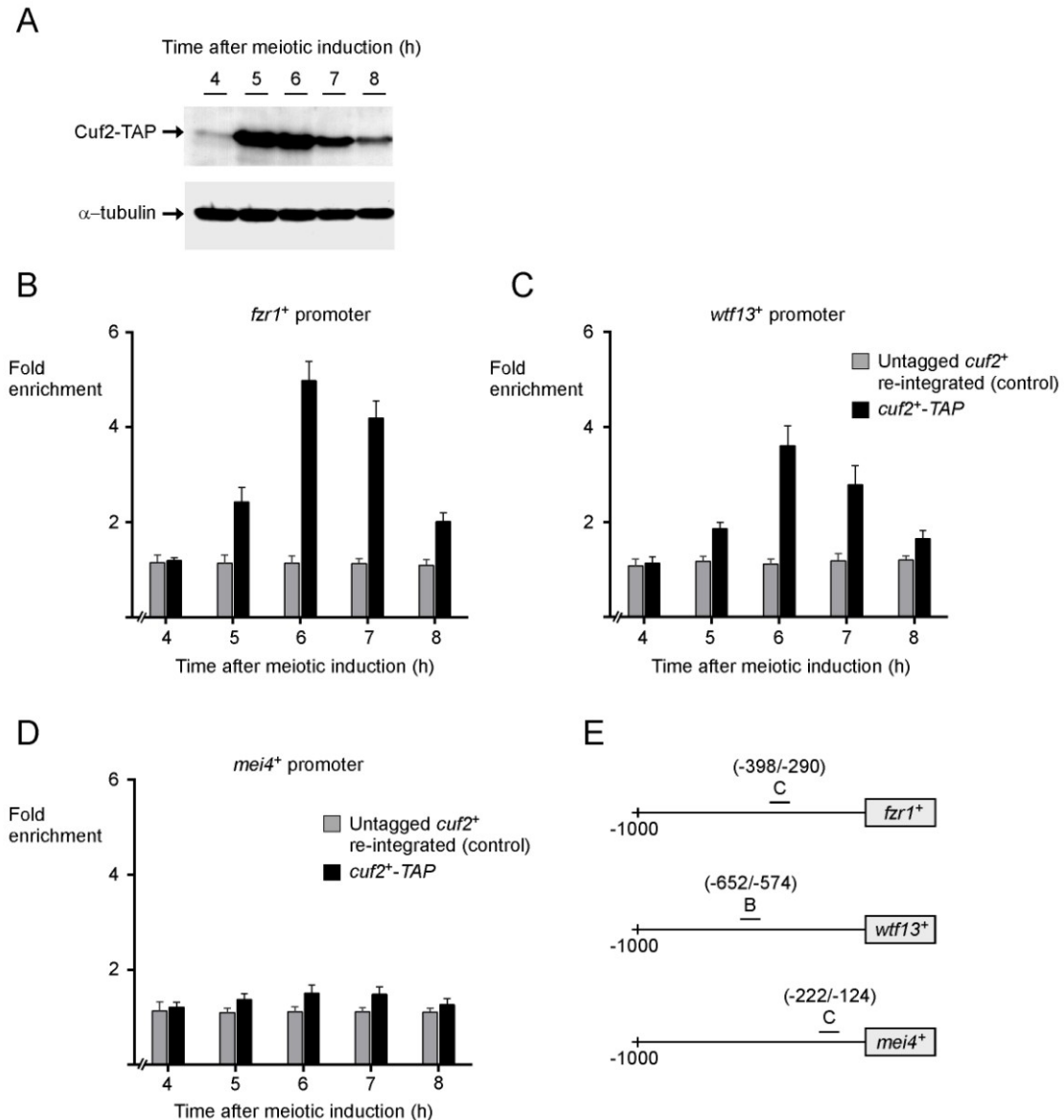


Fig. 2. *Cuf2* interacts with *fzf1*⁺ and *wtf13*⁺ promoters mostly in middle-phase meiosis. *A*, *pat1-114/pat1-114 cuf2Δ/cuf2Δ* cells expressing Cuf2-TAP were synchronously induced to undergo meiosis. Protein extracts were analyzed by Western blots for steady-state protein levels of Cuf2-TAP and α-tubulin at different time points after meiotic induction. *B-D*, Synchronized cells described in *panel A* were used for ChIP assays. *pat1-114/pat1-114 cuf2Δ/cuf2Δ* cells expressing an integrated untagged *cuf2*⁺ allele were also synchronized. Following induction of meiosis, chromatin was immunoprecipitated using resin-bound anti-mouse IgG antibodies at the indicated time points. Specific regions of *fzf1*⁺, *wtf13*⁺, and *mei4*⁺ promoters were analyzed by qPCR to determine Cuf2-TAP occupancy. Binding of Cuf2-TAP to promoters was calculated as the enrichment of specific *fzf1*⁺, *wtf13*⁺, and *mei4*⁺ promoter regions relative to a 18S ribosomal DNA coding region. ChIP data were calculated as values of the largest amount of chromatin measured (fold enrichment). Results are shown as the averages ± S.D. of a minimum of three independent experiments. *E*, Schematic representation of *fzf1*⁺, *wtf13*⁺, and *mei4*⁺ promoter regions. Nucleotide

numbers refer to the position relative to the A of the initiator codon of each gene (*fzr1*⁺, *wtf13*⁺, or *mei4*⁺). Underlined capital letters indicate promoter regions that were used for qPCR analysis.

The association of Cuf2-TAP with the *fzr1*⁺ promoter was detected using primers amplifying a DNA region located between positions -398 and -290 (denoted region C) relative to the initiator codon of *fzr1*⁺ (Fig. 2E). To verify if this region was the best choice to detect binding of Cuf2-TAP to chromatin, other pairs of primers were used that were located farther upstream (positions -1032 to -896 [region A] and -649 to -505 [region B]) or downstream (positions -130 to -31 [region D] and +1038 to +1187 [region ORF C]) from the initiator codon of *fzr1*⁺ (Fig. 3A). Results of ChIP assays showed that region C produced the highest enrichment of immunoprecipitated chromatin (4.6-fold) in the presence of Cuf2-TAP relative to a 18S ribosomal DNA coding sequence that was used as a negative control (Fig. 3A). Use of regions B and D gave intermediate enrichment values (2.7- and 3.0-fold, respectively) of immunoprecipitated chromatin by Cuf2-TAP. In contrast, only very low levels of *fzr1*⁺ DNA were detected in immunoprecipitates using regions A (1.6-fold) and ORF C (1.7-fold) (Fig. 3A). In the case of the interaction of Cuf2-TAP with *wtf13*⁺ promoter, amplification of a DNA region located between positions -652 and -575 (denoted region B) produced the highest enrichment of immunoprecipitated chromatin (3.7-fold) relative to a control 18S ribosomal DNA coding sequence (Fig. 3B). Other *wtf13*⁺ regions located between positions -1047 to -903 (region A), -400 to -250 (region C), -184 to -88 (region D), and +858 to +979 (region ORF B) (relative to the initiator codon of *wtf13*⁺) were tested. These regions produced weaker enrichments of immunoprecipitated chromatin by Cuf2-TAP (A = 1.7-fold; C = 2.7-fold; D = 1.9-fold; and, ORF B = 1.4-fold) (Fig. 3B). When we used *mei4*⁺ promoter that is independent of Cuf2 for its regulation, results showed very weak or marginal enrichment of immunoprecipitated chromatin corresponding to different promoter regions (denoted A, B, C, and ORF B) relative to a 18S ribosomal DNA coding sequence that was used as a negative control (Fig. 3C). Furthermore, results showed that untagged Cuf2 (expressed in *cuf2Δ/cuf2Δ* cells) immunoprecipitated only background levels of *mei4*⁺ promoter regions (Fig. 3C). Taken together, these results identified two regions within *fzr1*⁺ and *wtf13*⁺ promoters that are required for maximal Cuf2-TAP chromatin occupancy.

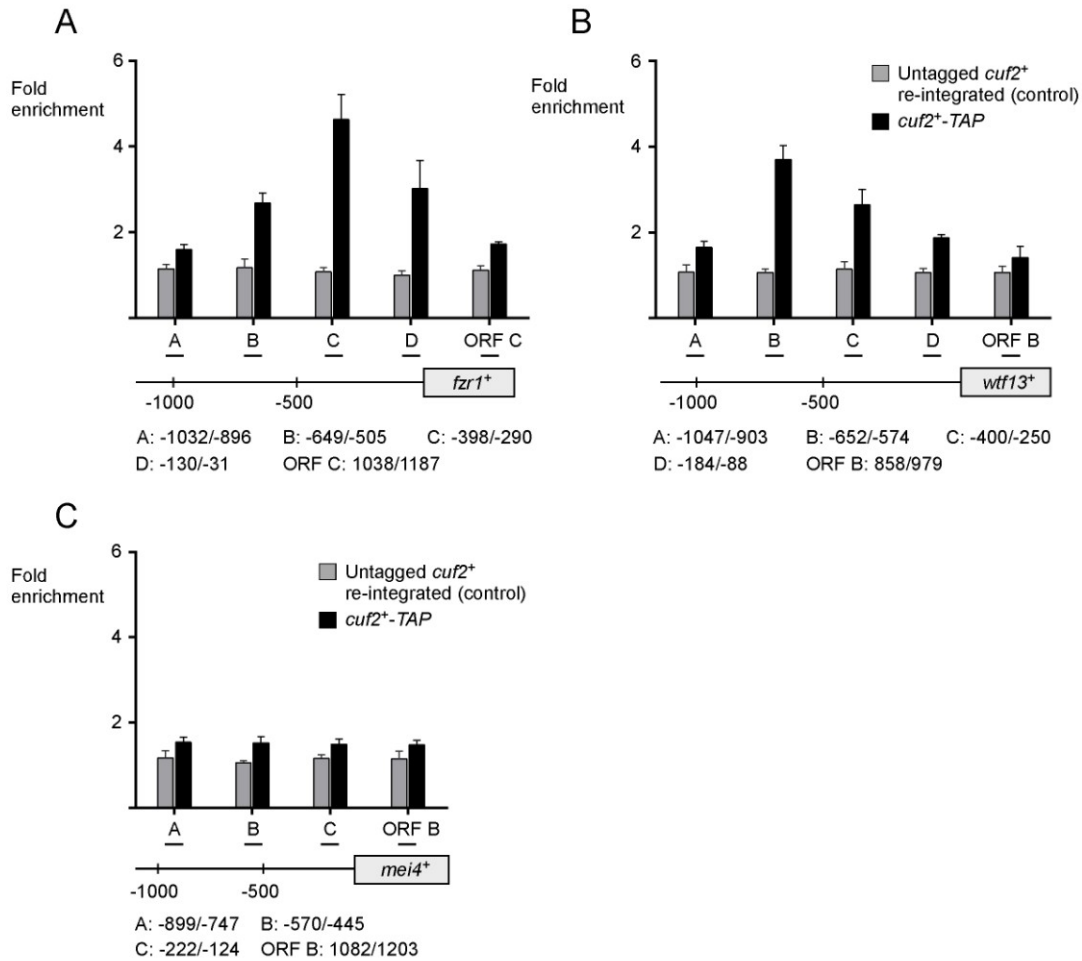


Fig. 3. Distribution of Cuf2-occupied regions in chromatin at *fzr1*⁺ and *wtf13*⁺ loci. *pat1-114/pat1-114 cuf2Δ/cuf2Δ* cells expressing an integrated untagged or a TAP-tagged *cuf2*⁺ allele were synchronously induced to undergo meiosis. After 6 h of meiotic induction, chromatin was immunoprecipitated using anti-mouse IgG antibodies. Following chromatin preparation, specific regions (indicated with *underline letters A – D and ORF B/C*) of *fzr1*⁺ (panel A), *wtf13*⁺ (panel B) and *mei4*⁺ (panel C) promoters were analyzed by qPCR to determine Cuf2 occupancy. ChIP results are presented as enrichments of specific *fzr1*⁺, *wtf13*⁺, or *mei4*⁺ promoter regions relative to a 18S ribosomal DNA coding region. Data were calculated as values of the largest amount of chromatin measured (*fold enrichment*) and results are shown as the averages ± S.D. of a minimum of three independent experiments. Nucleotide numbers refer to the position relative to the A of the initiator codon of each gene (*fzr1*⁺, *wtf13*⁺, or *mei4*⁺).

Cuf2 modulates RNA polymerase II chromatin occupancy at *fzr1*⁺ and *wtf13*⁺ transcribed regions. RNA polymerase II (Pol II) is a multi-subunit enzyme that transcribes specific genes into mRNA in eukaryotes (Sainsbury *et al.*, 2015). Transcriptional regulators control

either positively or negatively the rate of transcription through a myriad of different mechanisms that affect Pol II occupancy at specific coding regions of target genes (Jonkers et al., 2015). We used a Pol II ChIP assay to determine whether Cuf2 regulated meiotic gene expression through a transcriptional mechanism. Analysis of Pol II chromatin occupancy was performed using an anti-Rpb1 antibody that recognizes the heptapeptide sequence YSPTSPS, which is found in multiple copies at the C-terminal domain (CTD) of Pol II (Sims et al., 2004). *pat1-114/pat1-114 cuf2⁺/cuf2⁺* and *pat1-114/pat1-114 cuf2Δ/cuf2Δ* cells were synchronously induced into meiosis and then fixed (formaldehyde) every hour from 4 to 8 h after meiotic induction. Primers that hybridized at the 3' end of *fzr1⁺* (positions +1038 to +1187), *wtf13⁺* (positions +1440 to +1547), and *mei4⁺* (positions +1082 to +1203) coding regions were used for qPCR analysis (Fig. 4A). Results showed that in the case of *fzr1⁺* and *wtf13⁺*, the most significant differences with respect to Pol II chromatin occupancy between *cuf2⁺/cuf2⁺* and *cuf2Δ/cuf2Δ* cells were observed 6 h after meiotic induction (Fig. 4, B and C). In cells expressing Cuf2, association of Pol II with the *fzr1⁺* locus was enriched (37.6-fold) relative to a 18S ribosomal DNA coding region. Under the same growth conditions, *cuf2Δ/cuf2Δ* cells exhibited a 22.9-fold enrichment of Pol II, consistent with the interpretation that Cuf2 enhanced Pol II occupancy at the *fzr1⁺* locus (39.1% higher) (Fig. 4B). In the case of *wtf13⁺*, opposite results were observed after 6 h. Levels of Pol II enrichment were higher in cells lacking Cuf2 (32.8-fold) in comparison with those of a *cuf2⁺/cuf2⁺* strain (20.3-fold), revealing that Cuf2 decreased Pol II occupancy at the *wtf13⁺* locus (38.1% lower) (Fig. 4C). At the 6-h time point, Pol II chromatin occupancy at *mei4⁺* locus remained constant with similar levels of enrichment (30.2- and 31.2-fold) in *cuf2⁺/cuf2⁺* and *cuf2Δ/cuf2Δ* cells (Fig. 4D). In cells expressing Cuf2, results showed that the association of Pol II with the *fzr1⁺* locus was slightly enriched after 5 h of the meiotic program relative to cells lacking Cuf2 (*cuf2Δ/cuf2Δ*) (Fig. 4B). In contrast, after 7 and 8 h of meiotic induction, the association of Pol II with *fzr1⁺* was slightly lower in *cuf2⁺/cuf2⁺* cells than that observed in *cuf2Δ/cuf2Δ* cells (Fig. 4B). In the case of *wtf13⁺*, Pol II chromatin occupancy was slightly enriched in cells lacking Cuf2, except at the 4-h time point (Fig. 4C). Taken together, these results showed that at the 6-h time point of meiosis, Cuf2 promotes Pol II chromatin occupancy at *fzr1⁺*, whereas it decreases Pol II chromatin occupancy at *wtf13⁺*.

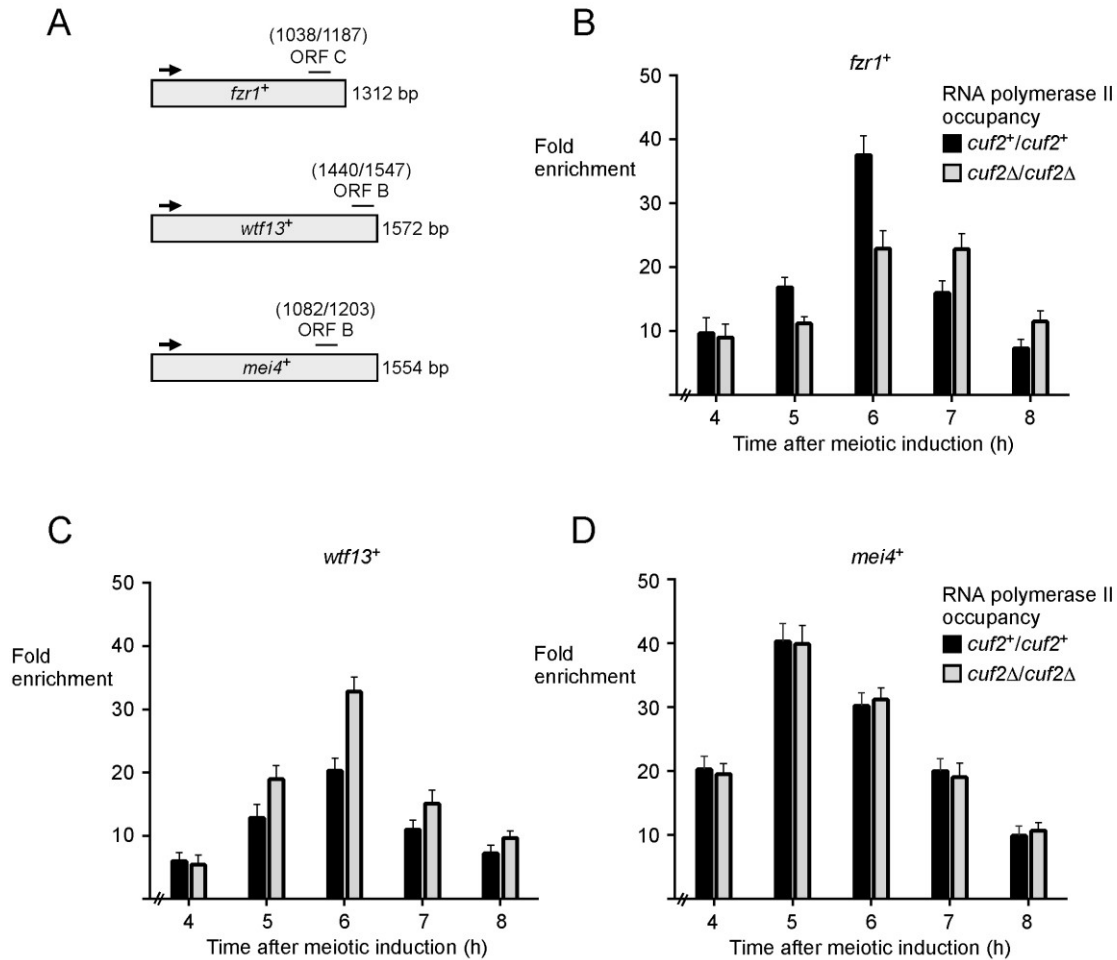


Fig. 4. Effect of the presence or absence of *Cuf2* on RNA polymerase II chromatin occupancy at $fzr1^+$ and $wtf13^+$ loci. A, Diagram representation of $fzr1^+$, $wtf13^+$, and $mei4^+$ genes in which ORF B and ORF C indicate locations of the primers that were used for qPCR analysis. Arrows indicate the direction of transcription. Nucleotide numbers refer to the position relative to the A of the initiator codon of each gene ($fzr1^+$, $wtf13^+$, or $mei4^+$). B – D, Cultures of *pat1-114/pat1-114 cuf2^+/cuf2^+* and *pat1-114/pat1-114 cuf2Δ/cuf2Δ* cells were induced to initiate and proceed through meiosis. At the indicated times after meiotic induction, chromatin was immunoprecipitated using antibodies against RNA polymerase II CTD. Following chromatin preparation, specific regions of $fzr1^+$, $wtf13^+$, and $mei4^+$ genes were analyzed by qPCR to determine RNA polymerase II occupancy. ChIP results are presented as enrichments of specific coding regions ($fzr1^+$, $wtf13^+$, or $mei4^+$) relative to a 18S ribosomal DNA coding region. Data were calculated as values of the largest amount of chromatin measured (fold enrichment). Results are shown as the averages \pm S.D. of a minimum of three independent experiments.

To confirm that indeed Cuf2 affected transcription *per se*, we dissected Pol II chromatin occupancy using primers covering the transcribed regions of *fzr1*⁺, *wtf13*⁺ and *mei4*⁺ in *cuf2Δ/cuf2Δ* and *cuf2*⁺/*cuf2*⁺ cells after 6 h of meiotic induction. In the case of the *fzr1*⁺ transcribed region, results showed that Pol II enrichment levels were consistently lower in *cuf2Δ/cuf2Δ* cells compared to those observed in *cuf2*⁺/*cuf2*⁺ cells (Fig. 5A). In contrast, Pol II enrichment levels were higher in *cuf2Δ/cuf2Δ* cells compared to those in *cuf2*⁺/*cuf2*⁺ cells within the *wtf13*⁺ transcribed region (Fig. 5A). As a control, results showed no significant variation in Pol II chromatin occupancy with respect to *mei4*⁺ transcribed region regardless of strain genotype. Taken together, results led support to the conclusion that Cuf2 positively or negatively influences meiotic gene expression by way of a transcriptional mechanism which affects Pol II chromatin occupancy at target gene coding regions.

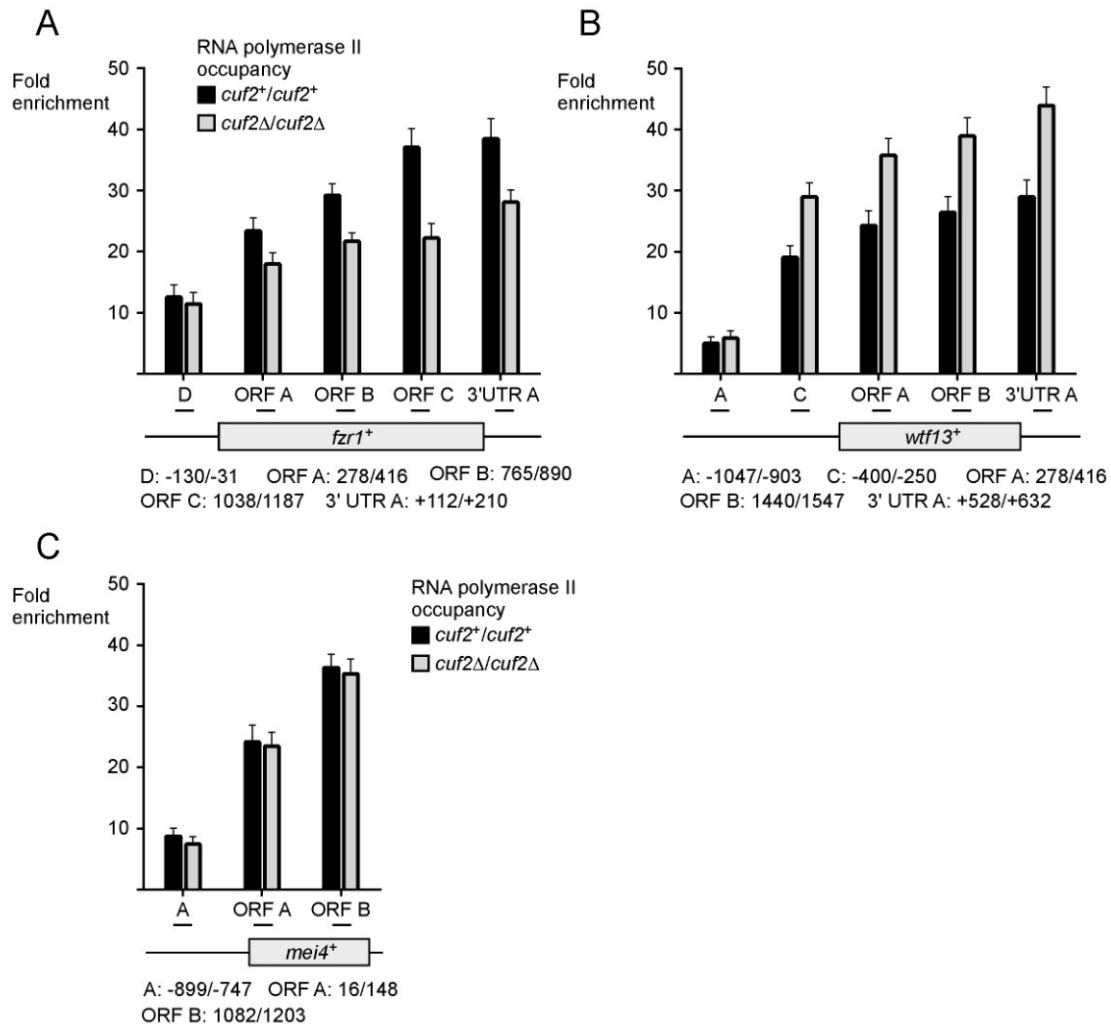


Fig. 5. *Cuf2* affects RNA polymerase II chromatin occupancy at *fzf1⁺* and *wtf13⁺* genes. *pat1-114/pat1-114 cuf2⁺/cuf2⁺* and *pat1-114/pat1-114 cuf2Δ/cuf2Δ* strains were synchronously induced into meiosis. At the 6-h meiotic time point, chromatin was immunoprecipitated using RNA polymerase II CTD-specific antibodies. Quantification of immunoprecipitated chromatin was performed by qPCR using primers that allowed amplification of several specific DNA regions (A, C, D, ORF A, ORF B, ORF C, and 3'UTR A), which spanned *fzf1⁺* (panel A), *wtf13⁺* (panel B), and *mei4⁺* (panel C) genes. ChIP results are presented as enrichments of specific noncoding and coding regions (*fzf1⁺*, *wtf13⁺*, or *mei4⁺*) relative to a 18S ribosomal DNA coding region. Data were calculated as values of the largest amount of chromatin measured (fold enrichment). Results are shown as the averages \pm S.D. of a minimum of three independent experiments. Arrows indicate the direction of transcription. Nucleotide numbers refer to the position relative to the A of the initiator codon of each gene (*fzf1⁺*, *wtf13⁺*, or *mei4⁺*).

Cuf2-dependent regulation of $fzr1^+$ and $wtf13^+$ requires the presence of Mei4. In *S. pombe*, the meiosis-specific Mei4 transcription factor induces the expression of a vast majority of middle-phase genes (Mata *et al.*, 2007). Genome-wide analyses using DNA microarrays have revealed that transcription of $fzr1^+$ and $wtf13^+$ genes is markedly reduced in meiotic cells lacking $mei4^+$ ($mei4\Delta/mei4\Delta$) (Mata *et al.*, 2007). An independent study using Northern blot assays has reported that $fzr1^+$ transcript was undetectable in $mei4\Delta/mei4\Delta$ mutant cells (Asakawa *et al.*, 2001). To corroborate these data and to gain a better understanding of the interrelationship between Cuf2 and Mei4, we examined the individual contribution of each transcription factor in the regulation of $fzr1^+$ and $wtf13^+$. Steady-state transcript levels of $fzr1^+$ and $wtf13^+$ were analyzed 5 to 7 h and 7 to 9 h after meiotic induction, respectively. Assessment of mRNA levels were performed in diploid $pat1-114/pat1-114$ $cuf2^{+/+}$ $mei4^{+/+}$, $pat1-114/pat1-114$ $cuf2\Delta/\Delta$ $mei4^{+/+}$, $pat1-114/pat1-114$ $cuf2^{+/+}$ $mei4\Delta/\Delta$, and $pat1-114/pat1-114$ $cuf2\Delta/\Delta$ $mei4\Delta/\Delta$ cells. In mutant cells lacking Mei4 ($mei4\Delta/\Delta$), results showed that $fzr1^+$ transcript was absent whereas $wtf13^+$ mRNA was barely detectable (Fig. 6, A and B). Consistent with our previous results, $fzr1^+$ mRNA expression was decreased (~40%) at the 6-h time point in $cuf2\Delta/\Delta$ $mei4^{+/+}$ mutant cells. Conversely, at the 7-h time point, inactivation of $cuf2^+$ ($cuf2\Delta/\Delta$) resulted in an increased (~48%) of $fzr1^+$ transcript levels in comparison to those seen in control cells. In the case of $wtf13^+$, $cuf2\Delta/\Delta$ $mei4^{+/+}$ cells showed sustained higher levels of $wtf13^+$ expression as compared with those observed in wild-type cells, specifically after 8 and 9 h. These results indicated that Cuf2 and Mei4 co-regulated $fzr1^+$ and $wtf13^+$ gene expression. Because $cuf2^+$ transcript is absent in cells lacking Mei4 ($mei4\Delta/\Delta$) (Ioannoni *et al.*, 2012), an inducible $nmt-cuf2^+-TAP$ allele was created in order to test whether Cuf2 could influence target gene expression independently of Mei4. Accordingly, steady-state transcript levels of $fzr1^+$ and $wtf13^+$ were analyzed in diploid $pat1-114/pat1-114$ $cuf2\Delta/\Delta$ $mei4^{+/+}$ and $pat1-114/pat1-114$ $cuf2\Delta/\Delta$ $mei4\Delta/\Delta$ cells carrying an integrated $nmt-cuf2^+-TAP$ allele. Cells expressing $nmt-cuf2^+-TAP$ were cultured in thiamine-free media for 12 h prior to synchronization of meiosis. The temperature was then shifted to 34°C so as to inactivate Pat1 and allow cells to undergo synchronous meiosis for 5, 6, 7, 8, or 9 h. This procedure was used to ensure that expression of Cuf2-TAP was optimal from the *nmt1* promoter. When expressed in $cuf2\Delta/\Delta$ $mei4\Delta/\Delta$ cells, Cuf2-TAP protein was totally ineffective to activate $fzr1^+$ or to

regulate *wtf13*⁺ gene expression, even though we detected robust steady-state levels of Cuf2-TAP protein (Fig. 6, A – C). This lack of regulation was not due to an interference of the TAP tag on Cuf2 protein as *fzr1*⁺ and *wtf13*⁺ gene regulation was rescued in *cuf2Δ/Δ* *mei4*^{+/+} cells carrying an integrated *nmt-cuf2*⁺-TAP allele. Furthermore, results showed that *cuf2*⁺ mRNA levels were constantly expressed 5 to 8 h after meiotic induction under the control of the *nmt*⁺ promoter, regardless of the presence of Mei4 (Fig. 6D). However, we observed that steady-state levels of Cuf2 protein were more stable in the absence of Mei4 (*mei4Δ/Δ*) in comparison to those seen in *mei4*^{+/+} cells (Fig. 6C). An explanation for this observation cannot be put forward at this time. Taken together, these results suggested that Mei4 is the major activator and that Cuf2 acts rather as a co-regulator of *fzr1*⁺ and *wtf13*⁺ gene expression.

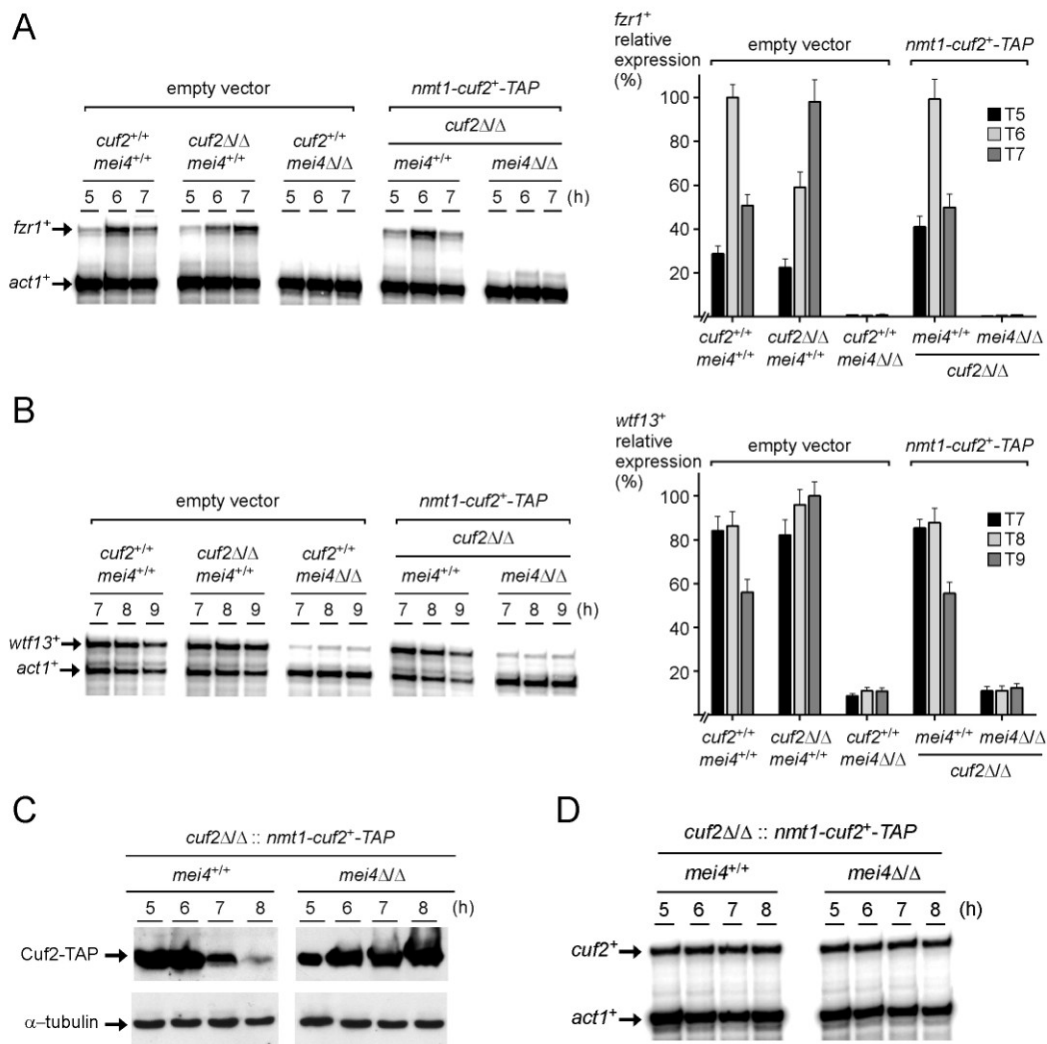


Fig. 6. Effect of *mei4Δ/mei4Δ* deletion on the expression of genes that are under the control of Cuf2. *A – B*, *pat1-114/pat1-114 cuf2⁺/cuf2⁺*, *pat1-114/pat1-114 cuf2Δ/cuf2Δ*, and *pat1-114/pat1-114 cuf2Δ/cuf2Δ mei4Δ/mei4Δ* strains were transformed either with pBPade6 (empty vector) or pBPade6*nmt⁺cuf2⁺-TAP* (Cuf2-TAP). Cultures were pre-synchronized by nitrogen starvation and then induced to undergo synchronous meiosis in the absence of thiamine. Following induction of meiosis, total RNA was isolated at the indicated time points. After RNA preparation, *fzf1⁺* (panel A) and *wtf13⁺* (panel B) steady-state mRNA levels were analyzed by RNase protection assays using actin (*act1⁺*) as an internal control. Histograms (right side) show quantification of the results of three independent RNase protection assays, including the experiment shown on the left side. *C*, Culture aliquots of *cuf2Δ/cuf2Δ* and *cuf2Δ/cuf2Δ mei4Δ/mei4Δ* cells expressing Cuf2-TAP were used to prepare whole protein extracts at the indicated time points after meiotic induction. Samples were analyzed by immunoblotting using anti-IgG and anti-α-tubulin antibodies to detect Cuf2-TAP and α-tubulin steady-state protein levels, respectively. *D*, Aliquots of the cultures described in panel C were analyzed for steady-state levels of *cuf2⁺*

and *act1*⁺ mRNAs. Total RNA was isolated and transcript levels of *cuf2*⁺ and *act1*⁺ (indicated with arrows) were examined by RNase protection assays.

In vivo binding of Cuf2 to its target gene promoters requires Mei4. Owing to the fact that in the absence of Mei4, Cuf2 by itself was unable to regulate *fzr1*⁺ and *wtf13*⁺ gene expression, we hypothesized that Mei4 was required to allow the binding of Cuf2 to its target gene promoters. To test this hypothesis, we performed ChIP experiments in diploid *pat1-114/pat1-114 cuf2Δ/Δ mei4⁺/mei4⁺* and *cuf2Δ/Δ mei4Δ/Δ* cells expressing either an untagged or a TAP-tagged version of Cuf2 under the control of the *nmf1*⁺ promoter. Enrichment levels of *nmf1*⁺-induced Cuf2 and Cuf2-TAP proteins were verified at *fzr1*⁺, *wtf13*⁺ and *mei4*⁺ promoters 5 and 7 h after meiotic induction and compared to enrichment levels of Cuf2-TAP expressed from its own promoter used as a reference. At the 6- and 7-h time points, results showed that in *cuf2Δ/Δ mei4⁺/mei4⁺* cells, *fzr1*⁺ and *wtf13*⁺ promoters were bound by Cuf2-TAP expressed from the *nmf1*⁺ promoter in a manner similar to that observed for Cuf2-TAP expressed from its own promoter (Fig. 7A). At the 6-h time point, *nmf1*⁺-Cuf2-TAP and -500Cuf2-TAP immunoprecipitated 4.1- and 4.6-fold, respectively, more chromatin corresponding to *fzr1*⁺ promoter compared to a 18S ribosomal region reference (Fig. 7A). In the case of *wtf13*⁺ promoter, chromatin enrichment levels by *nmf1*⁺-Cuf2-TAP and -500Cuf2-TAP were 3.4- and 3.8-fold, respectively. Anti-mouse IgG antibodies immunoprecipitated 3.4- and 3.9-fold more Cuf2-TAP (under the control of *nmf1*⁺ or its own promoter) associated with the *fzr1*⁺ promoter after 7 h of meiotic induction (Fig. 7A). The same antibodies immunoprecipitated 2.6- and 3.0-fold more Cuf2-TAP associated with *wtf13*⁺ promoter after 7 h. At the 5-h time point, ChIP analysis showed that Cuf2-TAP levels of occupancy were lower at *fzr1*⁺ and *wtf13*⁺ promoters, exhibiting 1.8- and 2.1-fold enrichment. The results from ChIP experiments showed that Cuf2-TAP failed to associate with a *mei4*⁺ promoter sequence, which was used as a negative control (Fig. 7A). In *cuf2Δ/Δ mei4Δ/Δ* cells, Cuf2-TAP (either expressed from *nmf1*⁺ or its own promoter) did not significantly associate with chromatin that corresponds to *fzr1*⁺, *wtf13*⁺ or *mei4*⁺ promoter (Fig. 7B). Taken together, these results revealed that association of Cuf2 with *fzr1*⁺ and *wtf13*⁺ promoters *in vivo* requires the presence of the transcription factor Mei4.

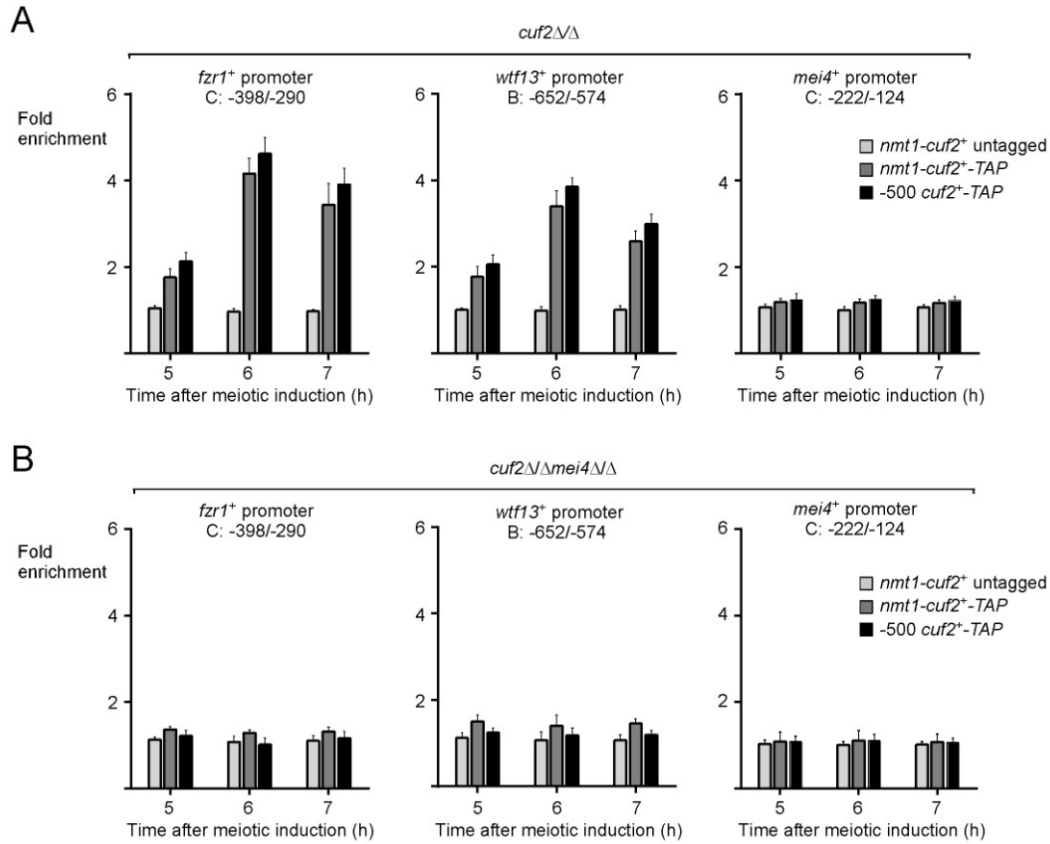


Fig. 7. *Loss of Mei4 abrogates in vivo chromatin binding of Cuf2.* A – B, ChIP analysis of *fzf1⁺*, *wtf13⁺*, and *mei4⁺* promoters in a *pat1-114/pat1-114 cuf2Δ/cuf2Δ* (panel A) or *pat1-114/pat1-114 cuf2Δ/cuf2Δ mei4Δ/mei4Δ* (panel B) strain expressing an integrated untagged or a TAP-tagged *cuf2⁺* allele under the control of its own promoter or the *nmt⁺* promoter. Chromatin was immunoprecipitated using anti-mouse IgG antibodies. Promoter regions of *fzf1⁺*, *wtf13⁺*, and *mei4⁺* were analyzed by qPCR to determine Cuf2 chromatin occupancy. TAP-tagged Cuf2 density at *fzf1⁺*, *wtf13⁺*, and *mei4⁺* promoters was determined as the enrichment of specific *fzf1⁺*, *wtf13⁺*, and *mei4⁺* promoter regions relative to a 18S ribosomal DNA coding region. Data were calculated as values of the largest amount of chromatin measured (fold enrichment). Results are shown as the averages \pm S.D. of a minimum of three independent experiments using distinct chromatin preparations.

Cuf2 and Mei4 mutually interact when they are ectopically expressed in vegetative cells. Given the fact that Mei4 was required for binding of Cuf2 to chromatin, protein-protein interaction assays were performed to investigate the possibility that Cuf2 physically associated with Mei4 in *S. pombe*. To perform these assays, we chose to artificially express Mei4 in vegetative cells as reported previously (Amorim *et al.*, 2010, Mata *et al.*, 2007, Nakase *et al.*, 2009). This approach was used because Mei4 is less susceptible to

proteolytic degradation in this system and has been shown to functionally induce middle-phase meiotic genes (>306 genes), including *cuf2*⁺, *fzr1*⁺, and *wtf13*⁺. To assess that *fzr1*⁺ and *wtf13*⁺ mRNAs were expressed upon ectopic expression of Mei4 in vegetative cells, we created a *cuf2*Δ *mei4*Δ double mutant strain in which a functional *nmt*⁺*mei4*⁺-GFP allele was introduced either with an untagged *cuf2*⁺ or with a TAP-tagged *cuf2*⁺ allele under the control of its own promoter. Mid-logarithmic cells containing the indicated alleles were grown in the absence of thiamine to induce Mei4-GFP expression, which in turn activated ectopic transcription of middle-phase meiotic genes. *fzr1*⁺ and *wtf13*⁺ transcripts were probed 16, 18, and 20 h after induction of the *nmt*⁺ promoter. In the case of *fzr1*⁺, results showed that its transcript was detected 18 h after the removal of thiamine from culture media. Subsequently, *fzr1*⁺ mRNA levels displayed a slight increase at later time point (20 h) (Fig. 8A). In the case of *wtf13*⁺, its expression profile exhibited an earlier response where transcript levels were detected 16 h after the removal of thiamine from culture media. At later time points (18 and 20 h), *wtf13*⁺ mRNA levels were higher in comparison to those observed after 16 h (Fig. 8A). Regardless of their detection time points and magnitude of expression, *fzr1*⁺ and *wtf13*⁺ mRNAs were induced in a Mei4-dependent manner in vegetative cells, a condition where normally they are expected not to be expressed (Asakawa *et al.*, 2001, Blanco *et al.*, 2001, Ioannoni *et al.*, 2012).

To test whether Cuf2 occupied *fzr1*⁺ and *wtf13*⁺ promoter regions under conditions where Mei4 was artificially expressed in vegetative cells, ChIP assays were used to assess the levels of promoter occupancy by a functional Cuf2-TAP after *mei4*⁺-GFP expression was induced for 16, 18, and 20 h. Results showed that Cuf2-TAP occupied *fzr1*⁺ and *wtf13*⁺ promoters with 3.4- and 3.7-fold enrichments respectively (relative to a 18S ribosomal DNA coding region used as a reference) 18 h after Mei4-GFP induction (Fig. 8B). Although the association of Cuf2-TAP with *fzr1*⁺ and *wtf13*⁺ promoters was weaker 16 h (1.4- and 2.6-fold, respectively) and 20 h (2.7- and 3.0-fold, respectively) after Mei4-GFP induction, presence of Mei4 resulted in an interaction of Cuf2 with these promoters *in vivo*. In contrast, there was no enrichment of Cuf2-TAP detected with the *mei4*⁺ promoter, as expected (Fig. 8B). Ectopic expression of Mei4-GFP in vegetative cells was confirmed by

fluorescence microscopy and by observation of membranous structures within cells as reported previously (Nakase *et al.*, 2009).

To further investigate the relationship between Mei4 and Cuf2, TAP pull-down experiments were performed using vegetative cells in which Mei4-GFP was ectopically induced for 18 h. Under these conditions, there is co-expression of *cuf2*⁺-TAP and most of the middle-phase meiotic genes that include *fzr1*⁺ and *wtf13*⁺ (Fig. 8A) (Mata *et al.*, 2007). Two additional strains co-expressing either *nmt*⁺*mei4*⁺-GFP and untagged *cuf2*⁺ or *nmt*⁺*mei4*⁺-GFP and (unfused) TAP alleles were used as controls. Total cell extracts were incubated in the presence of IgG-Sepharose beads that selectively bound (unfused) TAP polypeptide or TAP-tagged Cuf2. In the latter case, it allowed an enrichment of Cuf2 and detection of putative interacting partners. Western blot analysis of the retained proteins revealed that Mei4-GFP was present in the immunoprecipitate fraction when Cuf2-TAP was retained by IgG-Sepharose beads (Fig. 8C). In contrast, Mei4-GFP was absent in the bound fraction of cells co-expressing TAP alone or untagged Cuf2 (Fig. 8C). Fractionation of the pull-down experiments was validated using an antibody directed against α -tubulin. Results showed that α -tubulin was present in total cell extracts but not in the retained protein fraction (Fig. 8C). To assess the steady-state protein levels of Cuf2-TAP, Western blot analyses of both the protein preparations and the bound fractions were performed using anti-IgG antibody (Fig. 8C).

Given that Cuf2 associated with Mei4 in a protein complex in pull down assays, we investigated their capacity to interact *in vivo* in *S. pombe*. In these experiments, Venus N-terminal fragment (VN) and Venus C-terminal fragment (VC) were fused to the C-terminal portions of Cuf2 and Mei4, respectively. *nmt*⁺*mei4*⁺-VC and *cuf2*⁺-VN alleles were co-transformed in *mei4* Δ *cuf2* Δ vegetative cells. After washing media and removing thiamine to express Mei4-VC, which itself activated the allele (*cuf2*⁺-VN) encoding Cuf2-VN, we examined cells by fluorescence microscopy. After 18 h, the VN-tagged Cuf2 and VC-tagged Mei4 produced BiFC signals, indicating that Cuf2 and Mei4 were forming heteromeric complexes (Fig. 8D). Cuf2-VN-Mei4-VC fluorescent complexes were seen primarily in nuclei (Fig. 8D). In this system co-expression levels of Cuf2-VN and Mei4-

VC were likely artificially higher than endogenous Mei4 levels since Mei4 was under the control of the *nmt*⁺ promoter. Fluorescence was observed in cells co-expressing Cuf2-VN and Mei4-VC fusion proteins but not in cells expressing only one of the fusion proteins. Furthermore, there was an absence of BiFC signal in cells co-expressing two unrelated proteins harboring the N- and C-terminal fragments of Venus, such as VN-Fep1 and Mei4-VC (Fig. 8D). Taken together, these results indicated that Cuf2 co-expressed with Mei4 in *cuf2Δ mei4Δ* cells proliferating in mitosis interacted with Mei4 and localized to the nucleus where it occupied target gene promoter regions.

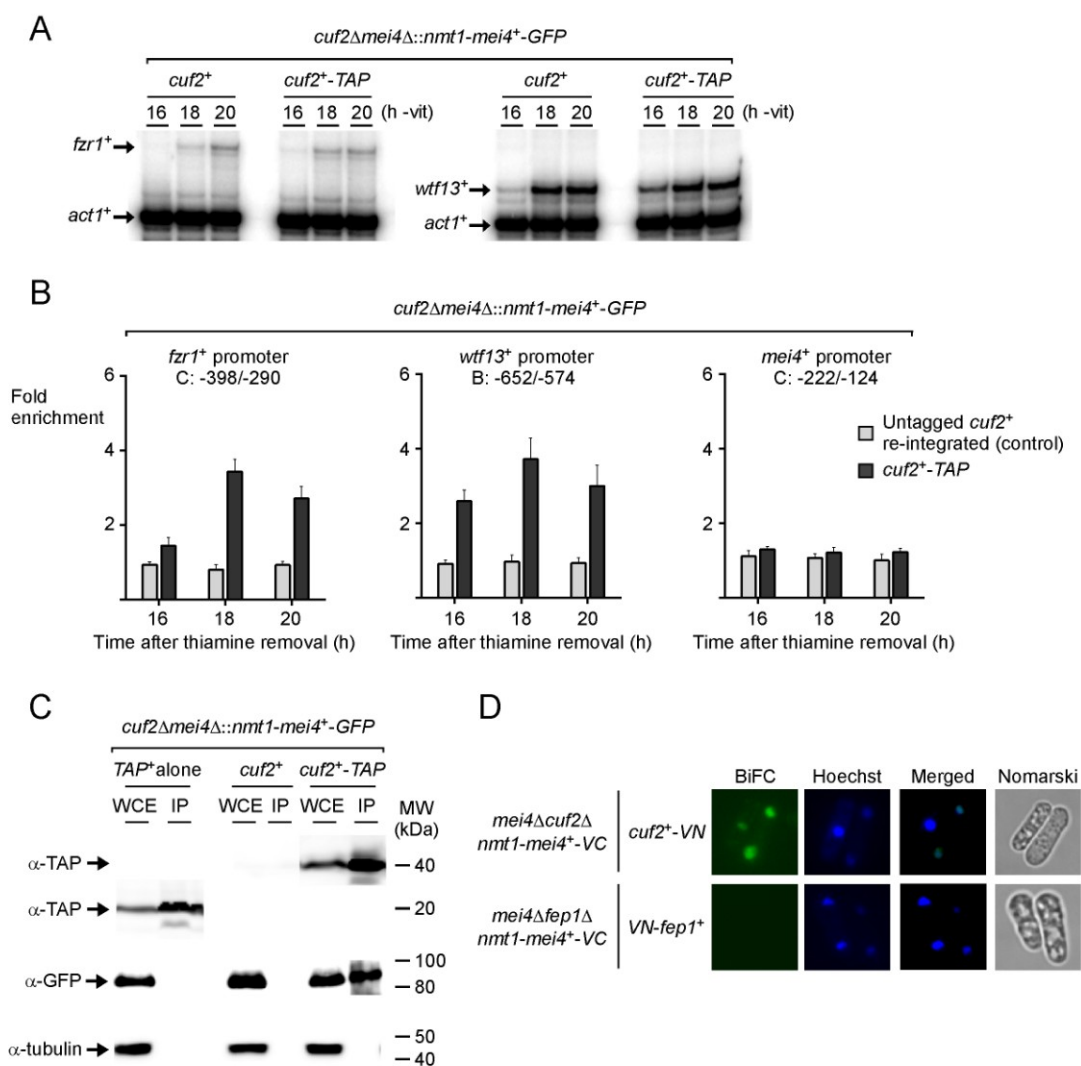


Fig. 8. *Cuf2* and *Mei4* co-expressed in cells proliferating in mitosis interacted with each other. A, *cuf2Δ mei4Δ* cells were co-transformed with untagged or TAP-tagged *cuf2*⁺ and *nmt*⁺*mei4*⁺-GFP fusion alleles. When expressed in cells proliferating in mitosis in

thiamine-free medium, Mei4 ectopically induced expression of middle-phase meiotic genes, including *fzr1*⁺, *wtf13*⁺, and *cuf2*⁺. Representative expression profiles of the *fzr1*⁺ and *wtf13*⁺ mRNAs after 16 to 20 h of thiamine starvation are shown. *B*, Chromatin was immunoprecipitated and promoter regions of *fzr1*⁺, *wtf13*⁺, and *mei4*⁺ were analyzed by qPCR to determine Cuf2 occupancy. TAP-tagged Cuf2 density at *fzr1*⁺, *wtf13*⁺, and *mei4*⁺ promoters was determined as the enrichment of specific *fzr1*⁺, *wtf13*⁺, and *mei4*⁺ promoter regions relative to a 18S ribosomal DNA coding region. Data were calculated as values of the largest amount of chromatin measured (*fold enrichment*). Results are shown as the averages \pm S.D. of a minimum of three independent experiments using separate chromatin preparations. *C*, Mitotic cells artificially co-expressing GFP-tagged Mei4 and TAP-tagged Cuf2, GFP-tagged Mei4 and untagged Cuf2, or GFP-tagged Mei4 and TAP alone were grown in thiamine-free medium for 18 h. Whole-cell extracts (WCE) were subjected to immunoprecipitation (IP) using IgG-Sepharose beads. The bound proteins were eluted and analyzed by immunoblot assays using a mouse anti-GFP antibody (α -GFP). As controls, aliquots of whole-cell extracts and bound fractions were probed with an anti-mouse IgG antibody (α -IgG) and an anti-tubulin antibody (α -tubulin). *D*, Cells were grown to early-logarithmic phase and then transferred to a thiamine-free medium for 18 h. Mitotically growing cells co-expressing Mei4-VC and Cuf2-VN or Mei4-VC and VN-Fep1 were visualized by fluorescence microscopy using BiFC (far left) and Hoescht stain (center left). The merged images are shown in the center right panels, whereas Nomarski optics that were used to examine cell morphology are shown in far right panels.

Association of Cuf2 with the fzr1⁺ promoter requires FLEX motifs. Mei4 transcription factor contains a highly conserved forkhead-type DNA binding domain that recognizes the (G/A)TAAA(C/T)A consensus sequence known as the FLEX core motif (Abe et Shimoda, 2000, Horie *et al.*, 1998). Given that the presence of Mei4 was required for *fzr1*⁺ promoter occupancy by Cuf2, we tested whether binding of Cuf2 to chromatin at the *fzr1*⁺ promoter was FLEX-dependent. Using motif-based sequence analysis, we identified two putative FLEX-like elements in the promoter region of the *fzr1*⁺ gene (Fig. 9A). A first element, ⁻¹⁹⁸GTAAACAAACA⁻²⁰⁸ (FLEX-1), contained the core heptamer ((G/A)TAAA(C/T)A) and four bases (AACA) in the 3' flanking sequence that are known to be important for Mei4 binding (Abe et Shimoda, 2000). A second FLEX-like element (FLEX-2) possessed the sequence ⁻²⁸⁷TAAACAAA⁻²⁹⁴. Although this element lacked the first base of the core heptamer, it contained two ⁻²⁹³AA⁻²⁹⁴ in the 3' flanking sequence that favor Mei4 binding. Furthermore, a similar FLEX element (missing the G-base of the core heptamer) has been found to play an important functional role for transcriptional activation of the meiosis-specific *rem1*⁺ gene by Mei4 (Moldon *et al.*, 2008). To characterize the functional contribution of FLEX-1 and FLEX-2 elements, a shorter version of the *fzr1*⁺ promoter

(positions -1 to -370) containing wild-type or mutated FLEX elements was integrated at the chromosomal locus of *fzr1*⁺, resulting in *fzr1*⁺ gene transcription that was under the control of a short promoter region of 370 bp (Fig. 9A). Results showed that the *fzr1*⁺ promoter region containing 370 bp generated an expression profile of *fzr1*⁺ mRNA that was virtually identical to that observed in the case of the full-length endogenous *fzr1*⁺ promoter (Fig. 9, B and C). Base pair mutations within the two FLEX elements (TACCCACCCAC instead of GTAAACAAACA, and GCCCAGCCC instead of TAAACAAA) dramatically reduced the steady-state levels of *fzr1*⁺ mRNA 6 h after meiotic induction (Fig. 9, B and C). Results showed that only low levels of expression were observed, especially 7 and 8 h after meiotic induction. As an additional control, a truncated version of the *fzr1*⁺ promoter (positions -1 to -156) lacking FLEX element was also integrated at the chromosomal locus of *fzr1*⁺, thereby replacing full-length promoter by a short regulatory region up to -156 from the initiator codon of *fzr1*⁺. In this case, *fzr1*⁺ transcript levels were very low, exhibiting only a slight increase 4 and 5 h after meiotic induction (Fig. 9, B and C).

Studies that involved replacement of the full-length *fzr1*⁺ promoter by different *fzr1*⁺ promoter regions (positions -1 to -370 and positions -1 to -156) at the chromosomal locus of *fzr1*⁺ were performed in *cuf2Δ/cuf2Δ* cells expressing Cuf2-TAP or *mei4Δ/mei4Δ* cells expressing Mei4-TAP. We assessed whether wild-type or mutated FLEX elements affected Cuf2-TAP ability to interact with the *fzr1*⁺ promoter *in vivo*. In the presence of wild-type FLEX elements in the context of the promoter region between -370 and -1, results showed that the association of Cuf2-TAP with the *fzr1*⁺ promoter was detected with 2.1-, 4.0-, and 3.4-fold enrichment after 5, 6, and 7 h of meiotic induction, respectively, relative to a 18S ribosomal DNA coding region (Fig. 9D). In contrast, there was no significant Cuf2-TAP chromatin occupancy in cells containing mutated FLEX or in absence of FLEX (positions -156 to -1) (Fig. 9D). Additional experiments using *mei4Δ/mei4Δ* cells expressing Mei4-TAP showed that wild-type FLEX elements were required for the association of Mei4 with the *fzr1*⁺ promoter. Results showed that Mei4-TAP was enriched 2.7-, 5.4-, and 3.2-fold after 5, 6, and 7 h of meiotic induction, respectively. As expected, no significant Mei4-TAP chromatin occupancy was observed in cells containing mutated FLEX or no FLEX (positions -156 to -1) (Fig. 9D). Taken together, these results showed that multiple point

mutations in FLEX elements result in an inability for Cuf2 and Mei4 to interact with the *fzr1*⁺ promoter *in vivo*.

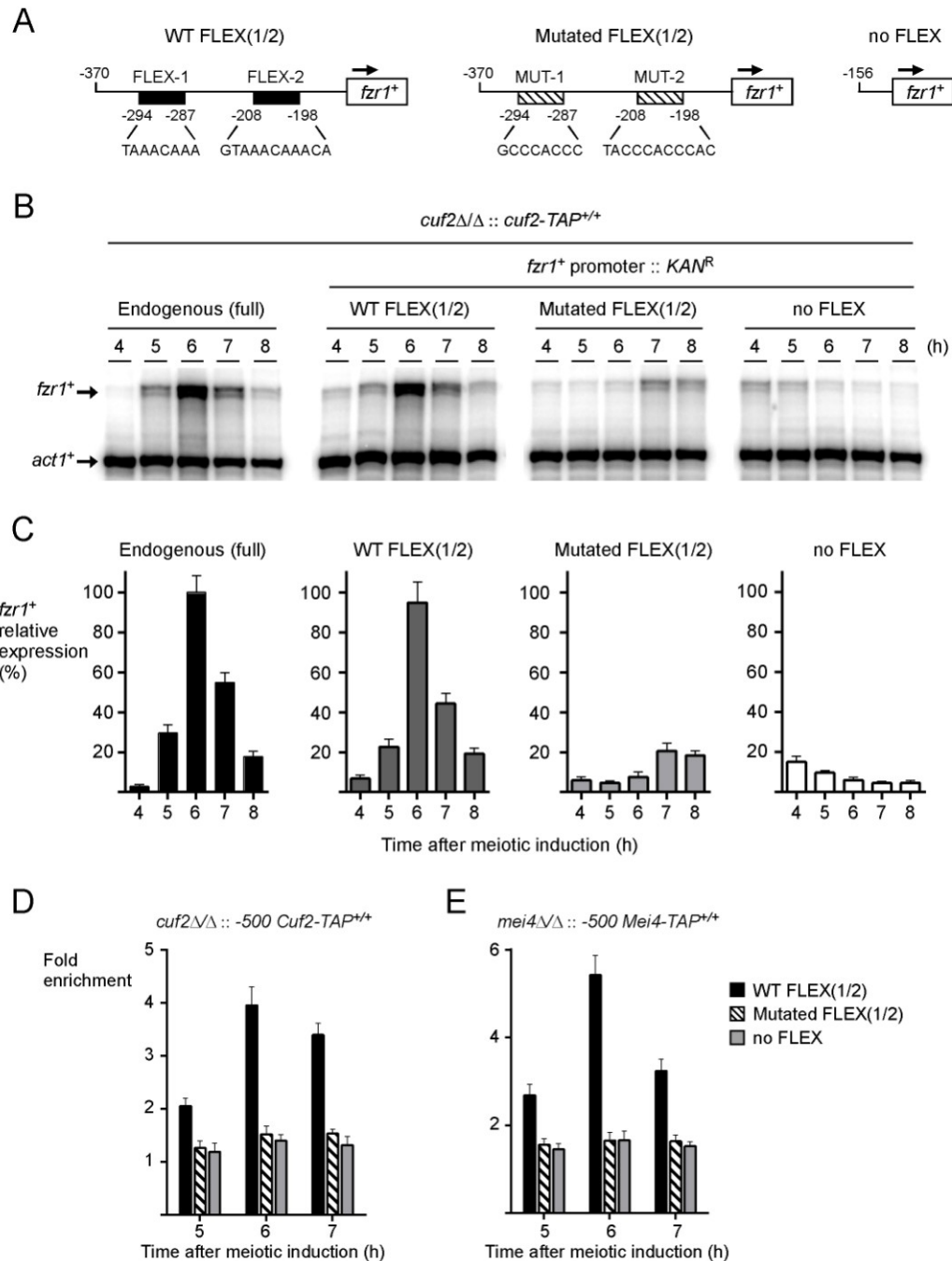


Fig. 9. Two FLEX elements in the *fzr1*⁺ promoter are required for maximal binding of Cuf2 to chromatin and its ability to co-regulate *fzr1*⁺ transcription. A, Schematic representation of a 370-bp *fzr1*⁺ promoter DNA fragment and its mutant derivative. An

additional 156-bp *fzr1*⁺ promoter region without FLEX element is depicted. The black boxes correspond to wild-type FLEX elements, whereas the white boxes represent mutant versions of FLEX. The nucleotide numbers refer to the positions of the cis-acting elements relative to that of the *fzr1*⁺ initiator codon. *B*, Promoter regions shown in *panel A* were integrated at the chromosomal locus of *fzr1*⁺, thereby replacing full-length wild-type promoter by truncated or mutant forms of the *fzr1*⁺ promoter. *pat1-114/pat1-114 cuf2Δ/cuf2Δ::cuf2*⁺-TAP/*cuf2*⁺-TAP cells containing these modified promoters underwent synchronous meiosis and steady-state levels of *fzr1*⁺ and *act1*⁺ mRNAs were analyzed at different time points after meiotic induction. *C*, Quantitative representations of the results of three independent RNase protection assays, including the experiment shown in *panel B*. Histogram values represent the averages ± SD of triplicate determinations. *D*, ChIP assays were performed from aliquots of cultures used in *panel B*. Binding of Cuf2-TAP to the *fzr1*⁺ promoter was calculated as the enrichment of the *fzr1*⁺ proximal regulatory region relative to a 18S ribosomal DNA coding region. *E*, ChIP assays were performed to determine Mei4 chromatin occupancy at the *fzr1*⁺ promoter using *pat1-114/pat1-114 mei4Δ/mei4Δ::mei4*⁺-TAP/*mei4*⁺-TAP cells. Mei4 promoter occupancy was calculated as the enrichment of the *fzr1*⁺ proximal regulatory region relative to a 18S ribosomal DNA coding region. For these experiments, full-length wild-type *fzr1*⁺ promoter was replaced by modified versions of the *fzr1*⁺ promoter shown in *panel A*.

DISCUSSION

In the present study, we have provided new molecular insights into the mechanism by which Cuf2 regulates the expression of middle-phase meiotic genes. Our data indicates that Cuf2 is a transcriptional co-regulator and has intrinsic antagonistic activities as it can either promote or prevent RNA Pol II occupancy along target gene transcribed regions. When *fzr1*⁺ and *wtf13*⁺ promoters were analyzed by ChIP assays, results showed that maximal promoter occupancy by Cuf2 occurred 6 h after meiotic induction. In the case of *fzr1*⁺, the 6-h time point coincided nicely with maximal chromatin occupancy by RNA Pol II and, consistently, with optimal induction of *fzr1*⁺ transcription. In the case of *wtf13*⁺ where Cuf2 acts as a negative regulator, data showed puzzling results since *wtf13*⁺ mRNA expression was still robust at the 6-h time point, which corresponds to the time point where the association of Cuf2 with the promoter was maximal. Furthermore, results showed a decrease of RNA Pol II occupancy in the presence of Cuf2 at the 6-h time point. The question thus arose how elevated *wtf13*⁺ mRNA levels can be explained after 6 h? In *S. pombe*, the meiosis-specific *meu5*⁺ gene encodes a RNA-binding protein that stabilizes the transcripts of several genes (~188) expressed throughout middle-phase meiosis, including *wtf13*⁺ (Amorim *et al.*, 2010). In the absence of Meu5 (*meu5*Δ/Δ), we have previously reported that *wtf13*⁺ mRNA levels were significantly reduced during middle-phase meiosis, as they drastically decreased as soon as 6 h after meiotic induction (Ioannoni *et al.*, 2012). In the absence of both Meu5 and Cuf2 (*meu5*Δ/Δ *cuf2*Δ/Δ), we further observed that *wtf13*⁺ transcript was up-regulated from the 6-h time point, indicating that the premature decrease in the abundance of *wtf13*⁺ transcript in *meu5*Δ/Δ cells was dependent of Cuf2 repressive activity (Ioannoni *et al.*, 2012). Therefore, it appears that although Cuf2 reduces RNA Pol II chromatin occupancy at the 6-h time point to repress *wtf13*⁺ transcription, Meu5 simultaneously stabilizes *wtf13*⁺ mRNA to extend its presence at least until 8 h after meiotic induction. In the absence of Cuf2 (*cuf2*Δ/Δ), we have previously shown that *meu5*⁺ expression was up-regulated (Ioannoni *et al.*, 2012). As a consequence, Meu5 is present for a longer period of time, thereby stabilizing and extending even longer the presence of *wtf13*⁺ transcripts to the later time points. These observations suggest that Cuf2 transcriptional control and Meu5 mRNA decay mechanisms act concomitantly to regulate meiotic gene expression.

Cuf2 has been originally identified as a protein sharing a strong sequence homology with an N-terminal 61-residue segment found in metalloregulatory transcription factors involved in either copper transport or detoxification pathways (Ioannoni *et al.*, 2012, Labbe *et al.*, 1999, Nevitt *et al.*, 2012, Rutherford et Bird, 2004). The former pathway includes the *S. cerevisiae* Mac1 and *S. pombe* Cuf1 transcription factors that are known to activate the expression of genes encoding components involved in high-affinity copper transport (Labbe *et al.*, Valeria CC, Robert SS, 2013). Functional characterization of Mac1 and Cuf1 have revealed that their DNA binding domains are found within their N-terminal regions, corresponding to the first 159 and 174 amino acid residues, respectively (Beaudoin *et al.*, 2003, Jensen *et al.*, 1998). The amino acid sequence similarities between Cuf2 and Cuf1 or Cuf2 and Mac1 are found primarily within the first 60-residue segment of Cuf2, which covers only a fraction of the full-length DNA binding domains of Cuf1 and Mac1. However, similar to Cuf1 and Mac1, Cuf2 harbors a conserved (K/R)GRP motif that may participate in the binding of nucleotides located within the minor groove of the DNA helix (Koch et Thiele, 1996). The copper detoxification pathway includes the *S. cerevisiae* Ace1 and *C. glabrata* Amt1 regulators that become active when yeast cells are grown under high concentrations of extracellular copper ions. Under these conditions, Ace1 and Amt1 activate the expression of metallothionein genes that encode small Cys-rich proteins, which are known to scavenge excess copper, thereby preventing the accumulation of copper to toxic levels. The DNA-binding domain of Ace1 and Amt1 is constituted of two sub-regions. One sub-region encompasses an N-terminal 40-residue segment that contains a (K/R)GRP motif, which shares high homology to the minor-groove-binding domain of the human high mobility group protein HMG-I(Y) (Geierstanger *et al.*, 1994, Koch et Thiele, 1996). A second sub-region corresponding to amino acid residues 41-110 contains four highly conserved Cys-X_(1/2)-Cys motifs, which are known to be essential for coordination of four copper ions and high-affinity sequence-specific DNA binding to the major groove (Winge, 1998). In the case of Cuf2, although its N-terminal region contains a conserved RGRP motif, it lacks two of the four critical Cys-X_(1/2)-Cys motifs and that makes the formation of the Ace1/Amt1-like copper regulatory domain highly unlikely. Taken together, these comparative observations of metalloregulatory transcription factors suggest

that Cuf2 may only contain a partial N-terminal DNA-binding domain and is consistent with the notion that Cuf2 may require an interacting partner for DNA binding efficiency.

Mei4 is a 517-amino acid protein (~58 kDa) that contains a forkhead-type DNA-binding domain within its N-terminus (residues 71 to 182) (Horie *et al.*, 1998). This domain of Mei4 binds to FLEX elements containing the heptamer core, (G/A)TAAA(C/T)A, and additional 3' flanking nucleotides such as AACA, which confer a stronger Mei4-dependent activation response (Abe et Shimoda, 2000). Mei4 also possesses a transcriptional activation domain that is located in its C-terminal region, corresponding to the last 140 amino acid residues (Horie *et al.*, 1998). Since it is well established that Mei4 binds DNA directly through its forkhead domain, the role of the AT-hook minor-groove-DNA-binding motif found in Cuf2 remains ambiguous within the context of a Mei4-Cuf2 hetero-complex formation. Human HMG-I(Y) family transcription factors have been shown to disturb minor-groove chromatin architecture through their AT-hook domain and that in turn enhances the exposition of the adjacent major groove sequence to interacting partners (Huth *et al.*, 1997). Sequence analysis has revealed stretches of AT-rich sequences adjacent to the two functional FLEX elements that were identified in *fzr1*⁺ promoter. The bulk of these observations suggest the possibility that Cuf2 makes contact with an AT-rich sequence adjacent to a FLEX motif. If this is the case, subsequent to its interaction with Mei4, Cuf2 could disturb minor-groove architecture and make the FLEX sequence more accessible for Mei4 binding. Given the fact that Mei4 induces the vast majority of middle-phase genes (Mata *et al.*, 2007) and that the FLEX motif is found in the promoters of almost all of Mei4 target genes (Abe et Shimoda, 2000), we envision that additional Mei4-dependent targets may also be positively regulated by Cuf2 during meiotic divisions.

Three interacting partners of Mei4 had been identified prior to this study. They are U1-70K, Prp11 and Cdc5, which are active components of the spliceosome (Moldon *et al.*, 2008). It has been shown that the recruitment of these three components at the coding region of *rem1*⁺ was Mei4-dependent and that enables RNA splicing from the *rem1*⁺ pre-mRNA during middle-phase meiosis (Moldon *et al.*, 2008). It is unlikely that Cuf2 is involved in the recruitment of these components, at least in the case of *rem1*⁺, since we

were unable to detect Cuf2 at the *rem1*⁺ locus using ChIP assays. The amino acid region of Mei4 that is required for its interaction with U1-70K, Prp11 and Cdc5 has not yet been identified. In the case of Cuf2-Mei4 association, it is likely that the amino acids responsible for their interaction differs from the one involves in the interaction between Mei4 and the components of the spliceosome. Identification of Mei4 and Cuf2 protein regions that are required for their mutual interaction must await a comprehensive deletion mapping analysis of each regulator.

Our results showed that Cuf2 had a positive regulatory effect on *fzr1*⁺ gene transcription and that its association with the promoter of *fzr1*⁺ was FLEX-dependent. In the case of *wtf13*⁺, results showed that Cuf2 negatively influenced its expression in a Mei4-dependent manner. Analogous to *fzr1*⁺, the promoter region of *wtf13*⁺ contains FLEX-like elements (positions -490 to -484, -667 to -661, and -734 to -728) that are located at the proximity of the region (positions -652 to -574) that gave optimal chromatin occupancy by Cuf2. This correlation suggests that FLEXs play a role as *cis*-acting regulatory elements in the Cuf2-dependent transcriptional control of *wtf13*⁺. Similarly to *wtf13*⁺, microarray analysis has previously shown that the expression of *SPAC1B2.03c* and *SPBC947.06c* middle-phase meiotic genes was up-regulated, exhibiting a sustained expression that persisted even during late meiosis in cells lacking Cuf2 (Ioannoni *et al.*, 2012). We were able to identify two FLEX-like elements located in the promoter of *SPAC1B2.03c* (positions -249 to -243 and -46 to -40) and three elements in the promoter of *SPBC947.06c* (positions -1442 to -1437, -1322 to -1316, and -1189 to -1195). Interestingly, Cuf2 occupancy of chromatin was maximal using primers at positions -255 to -101 for *SPAC1B2.03c* and at positions -1450 to -1301 for *SPBC947.06c*, which are located in close proximity with the FLEX-like elements found in these promoters. Together, these observations suggest that Cuf2 may be associated with Mei4 through a FLEX-type element for the timely repression of meiotic genes at the end of middle phase.

The *S. cerevisiae* Ndt80 regulator shares functional similarities with Mei4 as they are both primary transcriptional activators of numerous middle-phase meiotic genes (Chu *et al.*, 1998, Chu et Herskowitz, 1998, Mata *et al.*, 2007). Furthermore, both regulators are

required for meiotic cells to exit prophase I, initiate and go through the meiotic divisions. However, Ndt80 and Mei4 differ significantly with respect to amino acid sequences. For instance, Mei4 contains a forkhead-type DNA-binding domain that binds the FLEX motif ((G/A)TAAA(C/T)A), whereas Ndt80 possesses a DNA-binding domain that has an immunoglobulin-like fold, which specifically interacts with MSE elements (NCRCAA AW) (Hepworth *et al.*, 1995, Hepworth *et al.*, 1998). Interestingly, *S. cerevisiae* Sum1 transcriptional repressor also binds to these MSE elements and represses the expression of middle-phase meiotic genes during mitosis and both early and late meiosis (Klutstein *et al.*, 2010, Pierce *et al.*, 2003). When Sum1 and Ndt80 are present at the same time, they compete for binding to MSEs (Pierce *et al.*, 2003). However, at the onset of middle meiosis, Sum1 is degraded and Ndt80 becomes the unique regulator that binds to MSEs, thereby inducing middle meiotic genes (Lindgren *et al.*, 2000). In *S. pombe*, Fkh2 is another member of the forkhead family of transcription factors that has been shown to bind to FLEX motif. Fkh2 has been shown to be involved in mitotic cell cycle control as it represses the expression of several mitotic genes (Bulmer *et al.*, 2004, Papadopoulou *et al.*, 2008). Interestingly, recent studies have shown that Fkh2 also represses meiotic genes in proliferating cells, including *fzr1*⁺ (Chen *et al.*, 2012). Consequently, it is possible that Fkh2 acts as a negative regulator of meiotic middle-phase genes through binding of FLEX motif during phases that precede middle meiosis. If this is the case, Mei4 may need to compete with Fkh2 to activate middle-phase gene expression in a manner similar to the situation that has been characterized for Ndt80 and Sum1 in *S. cerevisiae*. In this case, Cuf2 may serve as a co-activator to facilitate Mei4 binding to the FLEX motif, thereby promoting optimal activation of *fzr1*⁺ transcription. On the other hand, our data indicates that Cuf2 counteracts the positive effect of Mei4 in the regulation of *wtfl3*⁺ gene expression. This negative regulation by Cuf2 may involve an unknown repressive partner that would become active at that stage of meiosis. Although we showed that Cuf2 was recruited to chromatin, we have not been able to identify a specific *cis*-acting DNA regulatory element for Cuf2. Further studies are ongoing to determine how Cuf2 and Mei4 (or other partners) co-regulate gene expression during meiosis.

ACKNOWLEDGMENTS

We are indebted to Dr. Gilles Dupuis for critical review of the manuscript and for his valuable comments.

References

1. Handel MA, Schimenti JC. Genetics of mammalian meiosis: regulation, dynamics and impact on fertility. *Nat Rev Genet.* 2010;11(2): 124-136. doi: 10.1038/nrg2723.
2. Sabatinos SA, Forsburg SL. Molecular genetics of *Schizosaccharomyces pombe*. *Methods Enzymol.* 2010;470: 759-795. doi: 10.1016/S0076-6879(10)70032-X.
3. Kim AM, Vogt S, O'Halloran TV, Woodruff TK. Zinc availability regulates exit from meiosis in maturing mammalian oocytes. *Nat Chem Biol.* 2010;6(9): 674-681. doi: 10.1038/nchembio.419.
4. Hogarth CA, Griswold MD. The key role of vitamin A in spermatogenesis. *J Clin Invest.* 2010;120(4): 956-962. doi: 10.1172/JCI41303.
5. Staub C. A century of research on mammalian male germ cell meiotic differentiation *in vitro*. *J Androl.* 2001;22(6): 911-926. doi:10.1038/nature09850
6. Li Y, Lam KS, Dasgupta N, Ye P. A yeast's eye view of mammalian reproduction: cross-species gene co-expression in meiotic prophase. *BMC Syst Biol.* 2010;4: 125. doi: 10.1186/1752-0509-4-125.
7. Harigaya Y, Yamamoto M. Molecular mechanisms underlying the mitosis-meiosis decision. *Chromosome Res.* 2007;15(5): 523-537. doi: 10.1007/s10577-007-1151-0.
8. Mata J, Lyne R, Burns G, Bähler J. The transcriptional program of meiosis and sporulation in fission yeast. *Nat Genet.* 2002;32(1): 143-147. doi: 10.1038/ng951.
9. Bähler J, Schuchert P, Grimm C, Kohli J. Synchronized meiosis and recombination in fission yeast: observations with *pat1-114* diploid cells. *Curr Genet.* 1991;19(6): 445-451. doi: 10.1007/BF00312735.

10. Doll E, Molnar M, Cuanoud G, Octobre G, Latypov V, Ludin K, et al. Cohesin and recombination proteins influence the G1-to-S transition in azygotic meiosis in *Schizosaccharomyces pombe*. *Genetics*. 2008;180(2): 727-740. doi: 10.1534/genetics.108.092619.
11. Mata J, Wilbrey A, Bähler J. Transcriptional regulatory network for sexual differentiation in fission yeast. *Genome Biol*. 2007;8(10): R217. doi: 10.1186/gb-2007-8-10-r217.
12. Abe H, Shimoda C. Autoregulated expression of *Schizosaccharomyces pombe* meiosis-specific transcription factor Mei4 and a genome-wide search for its target genes. *Genetics*. 2000;154(4): 1497-1508.
13. Horie S, Watanabe Y, Tanaka K, Nishiwaki S, Fujioka H, Abe H, et al. The *Schizosaccharomyces pombe mei4⁺* gene encodes a meiosis-specific transcription factor containing a forkhead DNA-binding domain. *Mol Cell Biol*. 1998;18(4): 2118-2129. doi: 10.1128/MCB.18.4.2118.
14. Ioannoni R, Beaudoin J, Lopez-Maury L, Codlin S, Bähler J, Labbé S. Cuf2 is a novel meiosis-specific regulatory factor of meiosis maturation. *PloS one*. 2012;7(4): e36338. doi: 10.1371/journal.pone.0036338.
15. Koch KA, Thiele DJ. Autoactivation by a *Candida glabrata* copper metalloregulatory transcription factor requires critical minor groove interactions. *Mol Cell Biol*. 1996;16(2): 724-734. doi: 10.1128/MCB.16.2.724.
16. Winge DR. Copper-regulatory domain involved in gene expression. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*. 1998;58: 165-195.
17. Kimata Y, Kitamura K, Fenner N, Yamano H. Mes1 controls the meiosis I to meiosis II transition by distinctly regulating the anaphase-promoting complex/cyclosome coactivators

- Fzr1/Mfr1 and Slp1 in fission yeast. *Mol Biol Cell*. 2011;22(9): 1486-1494. doi: 10.1091/mbc.E10-09-0774.
18. Pesin JA, Orr-Weaver TL. Regulation of APC/C activators in mitosis and meiosis. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2008;24: 475-499. doi: 10.1146/annurev.cellbio.041408.115949.
19. Asakawa H, Kitamura K, Shimoda C. A novel Cdc20-related WD-repeat protein, Fzr1, is required for spore formation in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Genet Genomics*. 2001;265(3): 424-435. doi: 10.1007/s004380000429.
20. Blanco MA, Pelloquin L, Moreno S. Fission yeast mfr1 activates APC and coordinates meiotic nuclear division with sporulation. *J Cell Sci*. 2001;114(Pt 11): 2135-2143.
21. Yu H. Cdc20: a WD40 activator for a cell cycle degradation machine. *Mol Cell*. 2007;27(1): 3-16. doi: 10.1016/j.molcel.2007.06.009.
22. Aoi Y, Arai K, Miyamoto M, Katsuta Y, Yamashita A, Sato M, et al. Cuf2 boosts the transcription of APC/C activator Fzr1 to terminate the meiotic division cycle. *EMBO Rep*. 2013;14(6): 553-560. doi: 10.1038/embor.2013.52.
23. Zhang MM, Wu PY, Kelly FD, Nurse P, Hang HC. Quantitative control of protein S-palmitoylation regulates meiotic entry in fission yeast. *PLoS Biol*. 2013;11(7): e1001597. doi: 10.1371/journal.pbio.1001597.
24. Forsburg SL. Comparison of *Schizosaccharomyces pombe* expression systems. *Nucleic Acids Res*. 1993;21(12): 2955-2956. doi: 10.1093/nar/21.12.2955
25. Amorim MJ, Cotobal C, Duncan C, Mata J. Global coordination of transcriptional control and mRNA decay during cellular differentiation. *Mol Syst Biol*. 2010;6: 380. doi: 10.1038/msb.2010.38.

26. Nakase Y, Hirata A, Shimoda C, Nakamura T. Ectopic overproduction of a sporulation-specific transcription factor induces assembly of prespore-like membranous compartments in vegetative cells of fission yeast. *Genetics*. 2009;183(3): 1195-1199. doi: 10.1534/genetics.109.106906.
27. Beaudoin J, Labbé S. Crm1-mediated nuclear export of the *Schizosaccharomyces pombe* transcription factor Cuf1 during a shift from low to high copper concentrations. *Eukaryot Cell*. 2007;6(5): 764-775. doi: 10.1128/EC.00002-07.
28. Ioannoni R, Beaudoin J, Mercier A, Labbé S. Copper-dependent trafficking of the Ctr4-Ctr5 copper transporting complex. *PloS one*. 2010;5(8): e11964. doi: 10.1371/journal.pone.0011964.
29. Jacques JF, Mercier A, Brault A, Mourer T, Labbé S. Fra2 is a co-regulator of Fep1 inhibition in response to iron starvation. *PloS one*. 2014;9(6): e98959. doi: 10.1371/journal.pone.0098959.
30. Ho SN, Hunt HD, Horton RM, Pullen JK, Pease LR. Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene*. 1989;77(1): 51-59.
31. Chen D, Toone WM, Mata J, Lyne R, Burns G, Kivinen K, et al. Global transcriptional responses of fission yeast to environmental stress. *Mol Biol Cell*. 2003;14(1): 214-229. doi: 10.1091/mbc.E02-08-0499.
32. Mercier A, Watt S, Bähler J, Labbé S. Key function for the CCAAT-binding factor Php4 to regulate gene expression in response to iron deficiency in fission yeast. *Eukaryot Cell*. 2008;7(3):493-508. doi: 10.1128/EC.00446-07.
33. Foiani M, Marini F, Gamba D, Lucchini G, Plevani P. The B subunit of the DNA polymerase alpha-primase complex in *Saccharomyces cerevisiae* executes an essential function at the initial stage of DNA replication. *Mol Cell Biol*. 1994;14(2): 923-933. doi: 10.1128/MCB.14.2.923.

34. Larochelle M, Lemay JF, Bachand F. The THO complex cooperates with the nuclear RNA surveillance machinery to control small nucleolar RNA expression. *Nucleic Acids Res.* 2012;40(20): 10240-10253. doi: 10.1093/nar/gks838.
35. Adam M, Robert F, Larochelle M, Gaudreau L. H2A.Z is required for global chromatin integrity and for recruitment of RNA polymerase II under specific conditions. *Mol Cell Biol.* 2001;21(18): 6270-6279. doi: 10.1128/mcb.21.18.
36. Jbel M, Mercier A, Pelletier B, Beaudoin J, Labbé S. Iron activates *in vivo* DNA binding of *Schizosaccharomyces pombe* transcription factor Fep1 through its amino-terminal region. *Eukaryot Cell.* 2009;8(4): 649-664. doi: 10.1128/EC.00001-09.
37. Sainsbury S, Bernecky C, Cramer P. Structural basis of transcription initiation by RNA polymerase II. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2015;16(3): 129-143. doi: 10.1038/nrm3952.
38. Jonkers I, Lis JT. Getting up to speed with transcription elongation by RNA polymerase II. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2015;16(3): 167-177. doi: 10.1038/nrm3953.
39. Sims RJ 3rd, Belotserkovskaya R, Reinberg D. Elongation by RNA polymerase II: the short and long of it. *Genes Dev.* 2004;18(20): 2437-2468. doi: 10.1101/gad.1235904.
40. Moldon A, Malapeira J, Gabrielli N, Gogol M, Gomez-Escoda B, Ivanova T, et al. Promoter-driven splicing regulation in fission yeast. *Nature.* 2008;455(7215): 997-1000. doi: 10.1038/nature07325.
41. Labbé S, Pena MM, Fernandes AR, Thiele DJ. A copper-sensing transcription factor regulates iron uptake genes in *Schizosaccharomyces pombe*. *J Biol Chem.* 1999;274(51): 36252-36260. doi: 10.1074/jbc.274.51.36252.

42. Nevitt T, Ohrvik H, Thiele DJ. Charting the travels of copper in eukaryotes from yeast to mammals. *Biochim Biophys Acta*. 2012;1823(9): 1580-1593 doi: 10.1016/j.bbamcr.2012.02.011.
43. Rutherford JC, Bird AJ. Metal-responsive transcription factors that regulate iron, zinc, and copper homeostasis in eukaryotic cells. *Eukaryot Cell*. 2004;3(1): 1-13. doi: 10.1128/EC.3.1.1-13.
44. Labbé S, Beaudoin J, Ioannoni R. Copper transport in fungi. In: Valeria CC, Robert SS, editors. *Metals in Cells*: John Wiley & Sons; 2013. pp. 163-174.
45. Beaudoin J, Mercier A, Langlois R, Labbé S. The *Schizosaccharomyces pombe* Cuf1 is composed of functional modules from two distinct classes of copper metalloregulatory transcription factors. *J Biol Chem*. 2003;278(16): 14565-14577. doi: 10.1074/jbc.M300861200.
46. Jensen LT, Posewitz MC, Srinivasan C, Winge DR. Mapping of the DNA binding domain of the copper-responsive transcription factor Mac1 from *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*. 1998;273(37): 23805-23811. doi: 10.1074/jbc.273.37.23805.
47. Geierstanger BH, Volkman BF, Kremer W, Wemmer DE. Short peptide fragments derived from HMG-I/Y proteins bind specifically to the minor groove of DNA. *Biochemistry*. 1994;33(17): 5347-5355. doi: 10.1021/bi00183a043.
48. Huth JR, Bewley CA, Nissen MS, Evans JN, Reeves R, Gronenborn AM, et al. The solution structure of an HMG-I(Y)-DNA complex defines a new architectural minor groove binding motif. *Nat Struct Biol*. 1997;4(8): 657-665. doi:10.1038/nsb0897-657.
49. Chu S, DeRisi J, Eisen M, Mulholland J, Botstein D, Brown PO, et al. The transcriptional program of sporulation in budding yeast. *Science*. 1998;282(5389): 699-705. doi: 10.1126/science.282.5389.699.

50. Chu S, Herskowitz I. Gametogenesis in yeast is regulated by a transcriptional cascade dependent on Ndt80. *Mol Cell*. 1998;1(5): 685-696. doi:10.1016/S1097-2765(00)80068-4.
51. Hepworth SR, Ebisuzaki LK, Segall J. A 15-base-pair element activates the *SPS4* gene midway through sporulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*. 1995;15(7): 3934-3944. doi: 10.1128/MCB.15.7.3934.
52. Hepworth SR, Friesen H, Segall J. NDT80 and the meiotic recombination checkpoint regulate expression of middle sporulation-specific genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*. 1998;18(10): 5750-5761. doi: 10.1128/MCB.18.10.5750.
53. Klutstein M, Siegfried Z, Gispan A, Farkash-Amar S, Zinman G, Bar-Joseph Z, et al. Combination of genomic approaches with functional genetic experiments reveals two modes of repression of yeast middle-phase meiosis genes. *BMC genomics*. 2010;11: 478. doi: 10.1186/1471-2164-11-478.
54. Pierce M, Benjamin KR, Montano SP, Georgiadis MM, Winter E, Vershon AK. Sum1 and Ndt80 proteins compete for binding to middle sporulation element sequences that control meiotic gene expression. *Mol Cell Biol*. 2003;23(14): 4814-4825. doi: 10.1128/MCB.23.14.
55. Lindgren A, Bungard D, Pierce M, Xie J, Vershon A, Winter E. The pachytene checkpoint in *Saccharomyces cerevisiae* requires the Sum1 transcriptional repressor. *EMBO J*. 2000;19(23): 6489-6497. doi: 10.1093/emboj/19.23.6489.
56. Bulmer R, Pic-Taylor A, Whitehall SK, Martin KA, Millar JB, Quinn J, et al. The forkhead transcription factor Fkh2 regulates the cell division cycle of *Schizosaccharomyces pombe*. *Eukaryot Cell*. 2004;3(4): 944-954. doi: 10.1128/ec.3.4.944-954.2004.

57. Papadopoulou K, Ng SS, Ohkura H, Geymonat M, Sedgwick SG, McNerny CJ. Regulation of gene expression during M-G1-phase in fission yeast through Plo1p and forkhead transcription factors. *J Cell Sci.* 2008;121(Pt 1): 38-47. doi: 10.1242/jcs.019489.
58. Chen HM, Rosebrock AP, Khan SR, Futcher B, Leatherwood JK. Repression of meiotic genes by antisense transcription and by Fkh2 transcription factor in *Schizosaccharomyces pombe*. *PLoS One.* 2012;7(1): e29917. doi: 10.1371/journal.pone.0029917.

DISCUSSION

Étant donné que plusieurs points de discussion ont déjà été abordés dans les deux manuscrits qui font l'objet de la présente thèse, cette prochaine section sera divisée en deux chapitres qui auront pour but de : 1- aborder de nouveaux points de discussion quant au phénotype causé par la perte de Cuf2 et 2- approfondir certaines hypothèses déjà abordées dans les manuscrits par rapport au mécanisme moléculaire par lequel Cuf2 régulerait l'expression de ses gènes cibles.

1. Phénotypes associés à la perte de Cuf2 dans les cellules méiotiques

Chez *S. pombe*, les divisions méiotiques et la formation de la membrane des spores (FMS) sont deux processus intimement liés. Lors de la méiose I, de nombreuses vésicules lipidiques apparaissent dans le cytoplasme. Quoique leur origine demeure toujours incertaine, plusieurs données suggèrent que ces vésicules servent de matière première à la FMS et proviennent en majeure partie du recyclage de membranes lipidiques du réticulum endoplasmique et de l'appareil de Golgi (Shimoda, 2004).

Lors de la métaphase II, les vésicules lipidiques sont recrutées au niveau de la face externe (i.e. cytoplasmique) de chaque centrosome et s'associent à différentes protéines qui leur servent d'échafaudage. Par la suite, lors de l'anaphase II, des vésicules supplémentaires sont recrutées et fusionnent avec celles préalablement mobilisées. Ce processus est dépendant d'une multitude de protéines associées aux voies de sécrétion, telles que celles des familles SNARE, SNAP et Rab. Au terme de l'anaphase II, une membrane lipidique partielle apparaît sur la face externe de chaque centrosome sous forme d'un croissant de lune. Une fois la méiose II complétée, quatre membranes circulaires et uniformes sont entassées les unes contre les autres et encapsulent chacune un jeu haploïde de chromosomes. Finalement, grâce à plusieurs protéines qui permettent la synthèse de différents polymères de sucres, la maturation des spores s'exécute afin de produire des ascospores viables et fonctionnelles (Shimoda, 2004).

Les résultats exposés dans cette thèse montrent qu'en absence de Cuf2, 75% des asques présentent des anomalies de FMS (Ioannoni *et al.*, 2012). En effet, plusieurs asques renferment un nombre anormal de membranes de spores : 42% d'entre eux en contiennent plus de quatre tandis que 18% en contiennent moins de quatre. De plus, 15% des asques renferment des spores dont les membranes sont difformes. Certaines d'entre elles sont asphériques et irrégulières tandis que d'autres ont une forme qui rappelle celle d'un shmoo. Ces observations ont mis en évidence que la fonction de Cuf2 est critique afin que la FMS se déroule normalement lors du cycle méiotique.

Dans un mutant *cuf2Δ/Δ*, les asques qui présentent des anomalies au niveau de la FMS exhibent systématiquement des aberrations au niveau de la formation des ascospores (Ioannoni *et al.*, 2012). Notamment, en absence de Cuf2, la majorité des asques produit renferment un nombre d'ascospores qui est inférieur à quatre. Conséquemment, ces asques aberrants présentent au moins un jeu haploïde de chromosomes qui n'est pas encapsulé (i.e. libre dans le cytoplasme). De plus, certaines ascospores sont de taille réduite ou d'apparence morcelée. Les ascospores qui présentent ces anomalies sont souvent dépourvues de tout matériel génétique. L'ensemble de ces observations indiquent que la fonction de Cuf2 est également critique afin que les ascospores se forment correctement et au bon nombre.

Finalement, en absence de Cuf2, la viabilité des ascospores est significativement réduite (Ioannoni *et al.*, 2012). En effet, lorsque les ascospores d'un mutant *cuf2Δ/Δ* sont transférées d'un milieu nutritif minimal sans azote à un milieu qui permet leur germination, soit un milieu riche avec azote, seulement 41% d'entre elles forment des colonies de cellules végétatives, comparativement à 97% pour une souche de type sauvage. Par conséquent, la présence de Cuf2 est également requise afin que la viabilité des ascospores soit optimale.

1.1. Explication des phénotypes observés en absence de Cuf2

Une étude de profilage ribosomal montre que lors de la sporulation chez *S. pombe*, l'abondance d'une protéine est généralement proportionnelle à sa quantité de transcrits (Duncan et Mata, 2014). Cette observation supporte le concept qu'un gène méiose-spécifique qui devient anormalement surexprimé par rapport à son niveau endogène peut mener à une surproduction de la protéine qui en découle. En effet, plusieurs études réalisées chez *S. pombe* ont révélé des exemples de gènes méiotiques qui, lorsque surexprimés, engendrent une surproduction de la protéine correspondante. Dans plusieurs cas, cette surproduction protéique génère des aberrations quant à la progression du cycle méiotique ou à la production d'ascospores viables (Garcia *et al.*, 2006, Nakamura *et al.*, 2004, Nakamura *et al.*, 2005, Nakase *et al.*, 2009, Okuzaki *et al.*, 2003).

On rapporte aussi de nombreux exemples de gènes méiose-spécifiques qui, lorsqu'ils sont exprimés de manière ectopique (i.e. hors de leur vague normale d'expression), provoquent des erreurs dans la progression du cycle méiotique ou dans la production d'ascospores (Chen *et al.*, 2012, Garcia *et al.*, 2006, Nakase *et al.*, 2009, Okuzaki *et al.*, 2003). Les résultats de ces études révèlent que les défauts engendrés sont principalement causés par deux phénomènes : 1- la protéine présente de manière ectopique continue d'exercer sa fonction à un moment qui n'est plus opportun pour la cellule et 2- cette protéine interfère avec la fonction d'une autre protéine et l'empêche de remplir son rôle au moment où elle est requise. Ces observations illustrent l'importance de la régulation temporelle des gènes méiose-spécifiques afin que le cycle méiotique et la sporulation se déroulent avec succès.

La comparaison du transcriptome de cellules méiotiques de type sauvage (*cuf2*^{+/+}) et dépourvues de Cuf2 (*cuf2Δ/Δ*) a permis l'identification d'un total de 247 gènes dont l'expression demeure anormalement élevée suite aux divisions méiotiques (Ioannoni *et al.*, 2012). Parmi ceux-ci, 143 sont des gènes intermédiaires et plusieurs d'entre eux codent pour des protéines dont la fonction peut être associée à la FMS. Basé sur les observations mentionnées dans les paragraphes précédents, il est fort possible qu'en absence de Cuf2, plusieurs de ces protéines demeurent anormalement présentes et actives suite à la FMS. Si tel est le cas, certaines d'entre elles pourraient fort possiblement engendrer des anomalies

quant à la FMS. Par exemple, une protéine qui continuerait de stimuler la FMS une fois que ce processus est normalement complété pourrait provoquer la formation de membranes excédentaires. Dans les prochains paragraphes, je décrirai des exemples concrets de gènes méiose-spécifiques qui pourraient engendrer ce type de défauts dans le mutant *cuf2Δ/Δ*.

1.1.1. FSM anormale : explications possibles

En absence de Cuf2, l'expression de quatre gènes intermédiaires associés à la FMS, soit *meu14⁺*, *mug142⁺*, *pik1⁺* et *ypt7⁺*, demeure anormalement élevée suite aux divisions méiotiques (Ioannoni *et al.*, 2012). Le gène *meu14⁺* code pour une protéine qui favorise l'initiation, l'expansion et la complétion de la membrane des spores en stimulant, entre autre, l'apport de vésicules lipidiques aux membranes en formation (Okuzaki *et al.*, 2003). En absence de Meu14, la FMS est aberrante : les membranes produites sont majoritairement incomplètes et de taille réduite.

Chez *S. pombe*, le gène intermédiaire *mug28⁺* code pour une protéine méiose-spécifique exprimée lors de la méiose II et qui possède trois domaines de liaison à l'ARN de type RRM. Une étude montre qu'en absence de Mug28, la protéine Meu14 persiste et demeure anormalement présente lors de la maturation des spores (Shigehisa *et al.*, 2010). Les données de cette étude suggèrent que Mug28 stimulerait la dégradation des transcrits de *meu14⁺* suite à la MII : en absence de Mug28, ces transcrits persisteraient au-delà de la deuxième division méiotique.

Cette même étude montre que dans un mutant *mug28Δ/Δ*, la FMS présente des défauts s'apparentant à ceux observés dans le mutant *cuf2Δ/Δ*. Leurs résultats indiquent qu'en absence de Mug28, environ 40% des asques renferment des spores dont la FMS est anormale. Le nombre de membranes formées est très souvent supérieur à quatre et sont parfois difformes. Dans certains cas, les membranes ont même l'apparence du shmoo tel qu'observé dans le mutant *cuf2Δ/Δ*. L'ensemble de leurs données suggèrent que ces phénotypes sont dus, en partie, à la présence ectopique de Meu14 suite aux divisions méiotiques. Notamment, leurs résultats montrent qu'en absence de Mug28, Meu14 demeure

active et continue de stimuler la FMS pendant l'étape de maturation des spores, provoquant ainsi la formation de membranes de spores excédentaires.

En tenant compte des données observées dans le mutant *mug28Δ/Δ*, on pourrait imaginer qu'en absence de Cuf2, la persistance des transcrits de *meu14*⁺ suite aux divisions méiotiques pourrait contribuer aux défauts de FMS. En effet, la présence prolongée de Meu14 pourrait maintenir la formation de membranes de spores pendant leur maturation et en générer ainsi un nombre excédentaire. De plus, les trois autres gènes intermédiaires impliqués dans la FMS dont les transcrits demeurent anormalement élevés en absence Cuf2 (e.g. *mug142*⁺, *pik1*⁺ et *ypt7*⁺) pourraient eux aussi contribuer aux anomalies de FMS observées dans le mutant *cuf2Δ/Δ*. Parmi eux, *ypt7*⁺, qui code pour une GTPase impliquée dans l'élongation de la membrane des spores, pourrait fort possiblement continuer de stimuler la FMS, en compagnie de Meu14, lors des étapes normalement associées à la maturation des spores (Kashiwazaki *et al.*, 2005).

L'expression de huit autres gènes intermédiaires, codant pour des protéines impliquées dans le métabolisme des lipides (table S4, *lipid metabolism*, section résultats p.89) demeure anormalement élevée en absence de Cuf2. Étant donné que chez *S. pombe*, l'apport de molécules lipidique est au centre de la FMS, il est fort possible que l'expression inadéquate de ces gènes contribue également aux phénotypes observés dans le mutant *cuf2Δ/Δ*. Notamment, l'expression de dix-huit gènes intermédiaires qui codent pour des protéines directement impliquées dans le trafic vésiculaire (table S4, *membrane trafficking/secretion*, section résultats p.90) demeure anormalement élevée en absence de Cuf2. Plusieurs de ces protéines sont d'ailleurs membres des familles SNARE, SNAP et Rab et sont essentielles au transport et à la fusion de vésicules lipidiques lors de la FMS (Shimoda, 2004). Parmi elles, la protéine Sec9, un homologue de la protéine humaine SNAP-25, détient un rôle critique dans la fusion de ces vésicules. En absence de Sec9, les membranes de spores sont totalement absentes (Nakamura *et al.*, 2005). Il est donc fort possible qu'en absence de Cuf2, une surproduction de Sec9 et de ces dix-sept autres protéines participent à la formation de membranes excédentaires lors de la maturation des spores. Il serait fort intéressant de vérifier si la surexpression du Ste9 pourrait engendrer

des anomalies quant à la formation des spores telles que celles observées en absence de Cuf2.

1.1.2. Production anormale d'ascospores : explications possibles

Chez la levure à fission, la maturation des spores dépend de la FMS. En effet, les résultats de plusieurs études indiquent que si la FSM est aberrante, les ascospores seront produites en nombre déficitaire et/ou présenteront différentes anomalies au niveau de leur morphologie (Shimoda, 2004). Par conséquent, les défauts de sporulation observés dans un mutant *cuf2Δ/Δ* pourraient en partie être attribuables aux défauts de FMS.

Normalement, la majorité des gènes intermédiaires codent pour des protéines qui sont impliquées dans les divisions méiotiques et la FMS (Mata *et al.*, 2002, Mata *et al.*, 2007). Par contre, certains gènes intermédiaires codent pour des protéines qui interviennent plutôt suite aux divisions méiotiques, c'est-à-dire pendant la maturation des spores. En effet, certains gènes sont exprimés à la fin de la MII en prévision d'intervenir dans les étapes plus précoces de la maturation des spores (Mata *et al.*, 2002, Mata *et al.*, 2007).

En absence de Cuf2, l'expression de quatre gènes qui codent pour des protéines impliquées dans les étapes précoces de la maturation des spores demeure anormalement élevée suite aux divisions méiotiques (table S4, *ascospore formation*, section résultats p.87-88). Parmi ceux-ci, on retrouve les gènes *mde10⁺* et *mok14⁺*. Mde10 est une endopeptidase de la famille ADAM qui participe à l'assemblage des différentes composantes de la couche externe de la paroi des spores (Nakamura *et al.*, 2004). Mok14, quant à elle, code pour une enzyme (e.g. une alpha-(1,4)-glycane synthase) qui catalyse la biosynthèse d'un polymère de glucose très similaire à l'amylose (Garcia *et al.*, 2006). Ce polymère représente un des constituants majeurs de la paroi des ascospores. En absence d'une de ces deux protéines, la maturation de la paroi des spores est déficiente. Dans les deux cas, les parois formées sont plus minces et moins résistantes à différents stimuli, tels que les chocs thermiques (*mok14Δ/Δ*) ou la présence d'éthanol (*mde10Δ/Δ*) (Garcia *et al.*, 2006, Nakamura *et al.*, 2004).

Une étude montre que lorsque le gène *mok14*⁺ est placé sous le contrôle d'un promoteur qui permet sa surexpression (i.e. le promoteur du gène *nmt1*⁺), la quantité de polymères d'amylose-*like* déposée sur la paroi des spores devient trois fois plus élevée que la normale (Garcia *et al.*, 2006). De plus, lorsque *mok14*⁺ est surexprimé de manière ectopique en conditions de croissance végétative, la protéine interfère avec la fonction de son paralogue mitotique Mok1. Les parois de ces cellules végétatives deviennent alors instables car celles-ci intègrent trop de polymères amylose-*like* au détriment de ceux normalement polymérisés par Mok1. Ces cellules présentent un taux de mortalité d'environ 50% et la morphologie au niveau de leur membrane est anormale (Garcia *et al.*, 2006).

Lors du cycle méiotique, trois autres paralogues de Mok14, soit Mok11, Mok12 et Mok13, sont également exprimés et participent à la maturation de la paroi des spores, à l'exception de Mok11, dont le rôle demeure toujours obscur (Garcia *et al.*, 2006). Bien que ces protéines interviennent toutes dans le même processus cellulaire, l'induction de chacun de leur gène correspondant est légèrement décalée l'une par rapport à l'autre. Dans l'ordre, *mok13*⁺ est induit en premier, ensuite survient l'induction *mok14*⁺ et finalement celle de *mok12*⁺. Les données existantes indiquent que cet ordre d'expression est critique afin que chaque protéine puisse remplir sa fonction au moment opportun, c'est-à-dire à différents moments lors de la maturation de la paroi des spores (Garcia *et al.*, 2006).

Mok12 possède un rôle déterminant dans la maturation de la paroi des spores. En absence de Mok12, seulement 15% des asques contiennent quatre ascospores tandis que la balance (85%) en contient moins de quatre (Garcia *et al.*, 2006). De plus, leur capacité à germer est largement réduite : en absence de Mok12, seulement 8% des ascospores produits sont en mesure de former des colonies de cellules végétatives. Or, étant donné que Mok14 est un paralogue méiotique de Mok12, il est possible qu'absence de Cuf2, la persistance de Mok14 dans les cellules méiotiques puisse interférer avec la fonction de Mok12. Si tel était le cas, ce phénomène pourrait contribuer aux phénotypes de diminution du nombre d'ascospores et de leur viabilité observés dans le mutant *cuf2Δ/Δ*. Par ailleurs, l'expression d'onze autres gènes normalement associés à la formation de la paroi des

cellules végétatives demeure élevée suite aux divisions méiotiques en absence de Cuf2 (table S4, *cell wall*, section résultats, p.88). Étant donné que ces gènes codent pour des protéines dont on présume également un rôle dans la formation de la paroi des spores, il est possible que des défauts quant à leur expression puissent engendrer des anomalies au niveau de la formation des ascospores (Mata *et al.*, 2002, Tanaka et Hirata, 1982).

Finalement, en absence de Cuf2, l'expression de plusieurs gènes codant pour des protéines ribosomales ou associées à la traduction est diminuée d'au moins 1,5 fois (au total 63 gènes, table S5, *ribosomal and translational processes*, section résultats p.94-96). Par conséquent, il est possible qu'en absence de Cuf2, la traduction soit globalement réduite, particulièrement suite aux divisions méiotiques. Si tel est le cas, l'abondance de plusieurs protéines pourrait être diminuée dans un mutant *cuf2Δ/Δ*. Un tel phénomène pourrait contribuer à une baisse des niveaux protéiques d'une multitude de protéines impliquées la production d'ascospores et ainsi, contribuer significativement aux phénotypes observés en absence de Cuf2.

1.1.3. Diminution de la viabilité des ascospores

En absence de Cuf2, seulement 41% des ascospores générées sont viables (Ioannoni *et al.*, 2012). Ce phénotype peut être attribuable à une combinaison de différents facteurs : ceux-ci seront discutés dans les prochains paragraphes.

Premièrement, il est évident que les ascospores qui ne renferment aucun matériel chromosomique ne possèdent pas la capacité de germer. Notamment, en absence de Cuf2, certaines ascospores sont dépourvues de tout matériel génétique (Ioannoni *et al.*, 2012). En effet, dans un mutant *cuf2Δ/Δ*, environ 40% des asques contiennent au moins une ascospore qui ne renferme aucun matériel chromosomique. Or, lors de la dissection des tétrades et de l'étalement des ascospores dans les essais de germination, l'appareil utilisé ne permet pas de distinguer celles dont une copie du génome est présente de celles dont le matériel génétique est absent. Par conséquent, une fraction des ascospores dont la viabilité est

vérifiée aura au départ aucune chance de germer, ce qui contribue inévitablement au phénotype de diminution de la viabilité des ascospores.

Plusieurs études ont illustré que chez *S. pombe*, la qualité de la FMS se répercute inévitablement sur la maturation des ascospores, mais également sur leur viabilité. La protéine Mug28 (dont il a été question dans les paragraphes précédents) représente un excellent exemple de ce phénomène. En absence de Mug28, la FMS et la maturation des ascospores sont toutes deux anormales, et seulement 40% des ascospores produites sont viables.

Bien qu'une corrélation entre la formation de la membrane/paroi des spores et leur viabilité soit claire, les explications qui se cachent derrière cette connexion demeurent hypothétiques. Que ce soit dans le cas d'un mutant *mug28Δ/Δ* ou *cuf2Δ/Δ*, il est possible que la surproduction de membranes amène des manquements au niveau de leurs composantes impliquées dans la germination (e.g. récepteurs, transporteurs de glucose). En d'autres mots, il se peut que ces composantes se retrouvent « diluées » par rapport à la quantité normale, ou encore mal intégrées dans les membranes. De plus, il est également possible que les ascospores n'ayant pas subi une maturation adéquate au niveau de leur paroi (comme dans le cas d'un mutant *mok12Δ/Δ*), et qui sont par conséquent plus sensibles à certains stimuli, subissent des dommages irréparables (e.g. des mutations) au niveau de gènes associés à la germination. D'ailleurs, il est concevable que la persistance de protéines intermédiaires suite aux divisions méiotiques interfèrent par la suite avec la fonction de protéines qui pourraient être impliquées dans les processus germinatifs.

1.1.4. Troisième division méiotique aberrante

En 2013, les résultats obtenus par groupe indépendant ont montré que lors des divisions méiotiques, Cuf2 participe à l'induction du gène intermédiaire *fzr1⁺* et ce, de manière directe (i.e. en s'associant avec sa région promotrice) (Aoi *et al.*, 2013). Dans notre étude publiée en 2016, nous avons confirmé que Cuf2 participait à l'activation transcriptionnelle de *fzr1⁺* et l'ensemble de nos données ont apporté plusieurs autres

précisions quant au mécanisme par lequel Cuf2 régule l'expression de *fzr1*⁺ (Ioannoni *et al.*, 2016). En effet, nos résultats ont montré que Cuf2 s'associait au niveau d'une région bien spécifique du promoteur de *fzr1*⁺ et pendant une fenêtre de temps bien précise. Notamment, nos résultats indiquent que Cuf2 et Mei4 interagissent physiquement au cours des divisions méiotiques afin de co-activer l'expression de *fzr1*⁺.

Fzr1 est une protéine qui module l'activité et la spécificité de l'APC/cyclosome (Asakawa *et al.*, 2001, Blanco *et al.*, 2001). Au terme de la MII, Fzr1 se complexe à l'APC/cyclosome et stimule le recrutement et la dégradation de la cycline Cdc13 via la voie ubiquitine-dépendante (Aoi *et al.*, 2013, Arata *et al.*, 2014, Izawa *et al.*, 2005, Kimata *et al.*, 2011, Yu, 2007). Ce mécanisme favorise l'inactivation de Cdk1 et l'arrêt de la ségrégation du matériel génétique et des divisions méiotiques. En absence de Fzr1, environ 40% des cellules subissent une division méiotique additionnelle suite à la MII (Aoi *et al.*, 2013). En effet, dans un mutant *fzr1*Δ/Δ, un fuseau de division supplémentaire se forme et un des jeux haploïdes de chromosomes subit une troisième division. Cette ségrégation aberrante engendre la formation d'un total de cinq jeux de chromosomes, dont deux inévitablement incomplets. De plus, dans un mutant *fzr1*Δ/Δ, la FMS ainsi que la maturation des spores sont anormales (Asakawa *et al.*, 2001). La majorité des spores présentent des membranes difformes et surnuméraires tandis que leur paroi est souvent fragmentée. D'ailleurs, les ascospores produites sont pour la plupart non-viables.

En absence de Cuf2, l'expression de *fzr1*⁺ est réduite de 40% et cet effet se répercute proportionnellement sur l'expression de la protéine (Aoi *et al.*, 2013). Par conséquent, dans un mutant *cuf2*Δ/Δ, environ 20% des cellules enclenchent une troisième division méiotique générant deux jeux chromosomiques incomplets. Par conséquent, la viabilité des deux ascospores qui découlent de cette division aberrante est nécessairement compromise. Ce phénomène contribue inévitablement à la diminution de la viabilité des ascospores d'un mutant *cuf2*Δ/Δ. D'ailleurs, il serait intéressant de vérifier la contribution exacte que cette troisième division aberrante apporte au phénotype. Pour ce faire, il serait nécessaire de créer une souche *cuf2*Δ/Δ dans laquelle on remplacerait la région promotrice de *fzr1*⁺ par un promoteur qui rétablirait son niveau d'expression endogène. Ensuite, on

pourrait comparer les pourcentages de germination de cette souche avec des souches contrôles *cuf2Δ/Δ* et *cuf2^{+/+}*. De cette façon, on pourrait dissocier les ascospores qui sont non-viables à cause de la troisième division méiotique, de ceux qui sont non-viables à cause de l'ensemble des autres phénotypes observés en absence de Cuf2.

Dans un mutant *fzr1Δ/Δ*, les défauts de FMS et de maturation des spores rapportés s'apparentent à ceux d'un mutant *cuf2Δ/Δ*. Puisqu'en absence de Cuf2, la protéine Fzr1 est significativement moins abondante (~ 40%), il est fort possible que cette réduction puisse également contribuer aux défauts de FMS et maturation des spores observés dans le mutant *cuf2Δ/Δ*. L'ensemble de toutes ces observations indiquent que la régulation de l'expression génique exercée par Cuf2 est critique à la FMS, à la maturation des spores et leur viabilité chez *S. pombe*.

2. Mécanisme par lequel Cuf2 régule l'expression génique

Cuf2 est une petite protéine (de masse moléculaire prédite de 20,1 kDa) qui compte 177 résidus (Ioannoni *et al.*, 2012). Son homologie de séquence avec les facteurs de transcription qui régulent l'homéostasie du Cu réside exclusivement au niveau de sa portion N-terminale (résidus 1 à 60) (Ioannoni *et al.*, 2012). Ce segment contient un total de 9 résidus Lys et Arg qui, basé sur des résultats obtenus avec Cuf1, pourraient permettre à Cuf2 d'entrer au noyau (Beaudoin et Labbe, 2006, Ioannoni *et al.*, 2012). Cette portion contient également un motif parfaitement conservé Cys-X₂-Cys-X₈-Cys-X-His qui, selon des résultats obtenus avec Amt1, pourrait lier un atome de zinc et faire parti d'un module facilitant des contacts directs avec l'ADN (Turner *et al.*, 1998). À ce module s'ajoute un motif *AT-hook* (R₃₆G₃₇R₃₈P₃₉) qui pourrait également être impliqué dans le contact direct de séquences nucléotidiques riches en A/T, particulièrement si celles-ci sont situées dans le sillon mineur de la double hélice d'ADN (Huth *et al.*, 1997).

À l'inverse, la portion C-terminale de Cuf2 semble être dépourvue de tout motif possédant une fonction connue. En effet, des recherches par alignement de séquences

protéiques sont demeurées infructueuses dans l'identification de motifs fonctionnels qui pourraient être rattachés à ce segment (résidus 61 à 177) (Ioannoni *et al.*, 2012).

Avant le début de mes travaux de thèse, l'étude du transcriptome du cycle méiotique avait identifié *cuf2*⁺ comme étant un gène intermédiaire, c'est-à-dire qui est induit lors des divisions méiotiques (Mata *et al.*, 2002). En tenant compte de cette donnée expérimentale unique et de l'ensemble de ces caractéristiques de structure, nous avons au départ émis l'hypothèse générale que Cuf2 devait réguler l'expression de gènes lors du cycle méiotique.

2.1. Récapitulation des données de la 1^{re} publication (2012)

Les résultats de notre première étude ont confirmé que *cuf2*⁺ était bel et bien un gène intermédiaire méiose-spécifique (Ioannoni *et al.*, 2012). En effet, nos données montrent que l'expression de *cuf2*⁺ coïncide avec les divisions méiotiques, tandis que son transcrit est absent lors de la croissance végétative, toutes conditions testées. De plus, l'induction de *cuf2*⁺ lors des divisions méiotiques est dépendante de Mei4. En effet, en absence de Mei4, le transcrit de *cuf2*⁺ est absent. Notamment, nos résultats montrent que Cuf2 est présente de l'anaphase I, jusqu'à la toute fin de la FMS, et que celle-ci se co-localise de manière constitutive avec le matériel génétique. Par conséquent, afin d'identifier un maximum de gènes qui seraient potentiellement régulés par Cuf2, nous avons comparé le transcriptome de cellules *cuf2*Δ/Δ à celui de cellules contrôles *cuf2*^{+/+} suite aux divisions et à la FMS, soit à 9 h après l'induction du cycle méiotique. Nos résultats ont dévoilé qu'en absence de Cuf2, l'expression de 298 gènes était diminuée, tandis que celle de 247 gènes était augmentée d'au moins 1,5 fois. Face à ces résultats, nous nous sommes davantage intéressés à la régulation des gènes dont l'expression était augmentée puisque ceux-ci étaient enrichis en gènes intermédiaires (e.g. 144 sur 247 comparativement à seulement 16 sur 298 pour ceux dont l'expression était réduite en absence de Cuf2).

Afin de valider les résultats obtenus par micropuces à ADN, nous avons examiné les niveaux de transcrits de quatre gènes dont l'expression était augmentée de plus de deux fois

en absence de Cuf2. Afin d'éviter tout biais dans cette sélection, nous avons choisis quatre gènes appartenant à des classes fonctionnelles différentes.

Nous avons donc comparé le niveau de transcrits des gènes *wtf13*⁺, *meu14*⁺, *SPAC1B2.03c* et *SPBC1348.01* de cellules *cuf2Δ/Δ* à celui de cellules *cuf2*^{+/+} à différents temps suite à l'inactivation de Pat1^{ts}. Nos résultats ont montré qu'en absence de Cuf2, l'expression de chacun de ces quatre gènes demeurait anormalement élevée à partir du temps 8 h jusqu'à la production d'ascospores matures (12-14h). Ces résultats indiquent que Cuf2 participe à la répression de plusieurs gènes intermédiaires de manière à ce que leur expression soit limitée aux divisions méiotiques et à la FMS.

2.2. Identification d'une nouvelle cible de Cuf2 : préambule au 2^e manuscrit

En 2013, une étude indépendante révélait que l'expression du gène intermédiaire *fzr1*⁺, qui code pour un activateur méiose-spécifique de l'APC/cyclosome, était régulée par Cuf2 (Aoi *et al.*, 2013). Plus précisément, leurs résultats ont montré que Cuf2 participe à l'induction du gène *fzr1*⁺ et ce, pendant une courte fenêtre de temps. En effet, leurs données illustrent qu'en absence de Cuf2, l'expression de *fzr1*⁺ est réduite d'environ 40% à la transition entre la MI et la MII. En utilisant une approche d'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP), les auteurs ont par la suite observé que Cuf2 était associée avec la région promotrice de *fzr1*⁺. Ces résultats représentaient la première démonstration que Cuf2 régule positivement, et de manière directe, l'expression d'un gène intermédiaire.

De notre côté, plusieurs questionnements ont découlé suite aux résultats présentés dans cette étude parue en 2013. Comment Cuf2 pouvait-il réguler positivement l'expression *fzr1*⁺ à la transition entre les deux divisions méiotiques pour ensuite réguler négativement l'expression d'un gène comme *wtf13*⁺ au terme des divisions et de la FMS? Cuf2 est-il également associé aux promoteurs des gènes dont il régule négativement l'expression? Si oui, comment et à quel moment? En 2016, nous avons publié un deuxième manuscrit dans l'optique de répondre à ces interrogations.

2.3. Récapitulation des données de la 2^e publication - 1^{re} partie

Étant donné que notre analyse du transcriptome de cellules *cuf2Δ/Δ* vs *cuf2^{+/+}* avait été réalisée à un temps différent (9 h) de celui correspondant à la transition entre les deux divisions méiotiques (~ 6 h), aucune variation dans l'expression de *fzr1⁺* n'avait été observée. Quoiqu'il en soit, dans notre étude parue en 2016, nous avons confirmé que l'expression de *fzr1⁺* était régulée par Cuf2 (Ioannoni *et al.*, 2016). En effet, en absence de Cuf2, nos résultats montrent que l'expression de *fzr1⁺* est réduite d'environ 40% au temps 6 h suite à l'initiation du cycle méiotique (tandis que celle de *wtf13⁺* est seulement augmentée à partir du temps 8 h).

De plus, nos résultats de ChIP confirment que *fzr1⁺*, mais également *wtf13⁺*, représentent des cibles directes de Cuf2. En effet, nos résultats montrent que Cuf2 s'associe à des régions spécifiques au niveau des promoteurs de *fzr1⁺* et de *wtf13⁺*. Notamment, nos résultats dévoilent que l'association de Cuf2 à ces régions promotrices est restreinte à une certaine fenêtre de temps lors de la progression du cycle méiotique. En effet, nous observons que Cuf2 s'associe aux promoteurs de ces deux gènes cibles exclusivement de 5 à 7 h suite à l'induction du cycle méiotique et que dans les deux cas, le niveau maximal d'enrichissement est obtenu au temps 6 h. Ces résultats posaient un premier problème : comment Cuf2 régule-t-il l'expression de *wtf13⁺* à partir du temps 8 h en étant associé à son promoteur entre 5 et 7 h suite à l'initiation du cycle méiotique.

En utilisant une approche de ChIP contre l'ARN polymérase II (pol II), nous avons donc vérifié si le mécanisme par lequel Cuf2 régule l'expression de *fzr1⁺* et de *wtf13⁺* était de la même nature, soit transcriptionnelle ou non. Nous avons donc examiné la densité relative d'ARN pol II présente au niveau des régions transcrites de ces gènes cibles en absence vs en présence de Cuf2. Nos résultats de ChIP-pol II montrent que Cuf2 régule l'expression de *fzr1⁺* et de *wtf13⁺* selon un mécanisme de nature transcriptionnelle. En effet, on observe qu'en absence de Cuf2, la densité relative d'ARN pol II le long de la région transcrite de *fzr1⁺* est significativement réduite au temps 6 h, tandis que celle-ci est significativement augmentée au même temps le long de la région transcrite de *wtf13⁺*. Ces

résultats indiquent que Cuf2 opère selon un mécanisme qui lui permet d'influencer la transcription de manière positive et négative à des promoteurs différents au même moment lors des divisions méiotiques.

2.3.1. Contrôle transcriptionnel vs post-transcriptionnel de l'expression des gènes intermédiaires

Nos résultats montrent que l'association de Cuf2 aux promoteurs de *fzr1*⁺ et de *wtf13*⁺ est maximale à 6 h suite à l'initiation du cycle méiotique (Ioannoni *et al.*, 2016). De plus, nos données indiquent que Cuf2 influence la présence d'ARN pol II au niveau des régions transcrites de ces deux gènes cibles au temps 6 h (Ioannoni *et al.*, 2016). Dans le cas de *fzr1*⁺, ces résultats sont cohérents puisque Cuf2 stimule positivement l'expression de cette cible au temps 6 h. Dans le cas de *wtf13*⁺, ces données demeurent à première vue déroutantes puisque le temps 6 h ne correspond pas du tout à celui où une répression Cuf2-dépendante est observée (soit au temps 8 h). Comment expliquer que Cuf2 s'associe au promoteur de *wtf13*⁺ et influence la présence d'ARN pol II au temps 6 h, mais que d'un autre côté, l'effet répressif de Cuf2 soit seulement observé à partir du temps 8 h? Dans les prochains paragraphes, je décrirai le phénomène pouvant expliquer comment ces données sont réconciliables.

Tel que mentionné précédemment, chez *S. pombe*, le gène intermédiaire *meu5*⁺ code pour une protéine méiose-spécifique qui se complexe à plusieurs transcrits intermédiaires (au total 188) et augmente leur stabilité de sorte que leur présence est prolongée jusqu'à la toute fin de la MII et de la FMS (Amorim *et al.*, 2010). Parmi les cibles de Meu5, on retrouve le transcrit de *wtf13*⁺. En effet, en présence de Meu5 (*meu5*^{+/+}), le niveau de transcrits de *wtf13*⁺ chute seulement à partir du temps 9 h tandis qu'en absence de Meu5 (*meu5*Δ/Δ), son niveau chute dès le temps 6 h (Amorim *et al.*, 2010, Ioannoni *et al.*, 2012).

Lorsque la régulation post-transcriptionnelle réalisée par Meu5 est retirée de l'équation, c'est-à-dire lorsque nous comparons le niveau de transcrits de *wtf13*⁺ d'un mutant *meu5*Δ/Δ à celui d'un double mutant *meu5*Δ/Δ*cuf2*Δ/Δ, l'expression de *wtf13*⁺

devient anormalement élevée à partir de 6 h suite à l'initiation du cycle méiotique, et non plus à partir de 8 h (Ioannoni *et al.*, 2012). En effet, en absence des deux régulateurs, soit Meu5 et Cuf2, le niveau de transcrit de *wtf13*⁺ est plus élevé à partir du temps 6 h comparativement au niveau observé en absence de Meu5 seulement. Ces observations indiquent que Cuf2 régule la transcription pol II-dépendante de *wtf13*⁺ au temps 6 h mais qu'en parallèle, Meu5 stabilise le transcrit de *wtf13*⁺ jusqu'à la fin des divisions méiotiques de sorte que l'effet répressif de Cuf2 n'est observé qu'à partir du temps 8 h.

Notamment, lorsque la région promotrice de *wtf13*⁺ est fusionnée à un gène rapporteur, on observe que l'effet répressif de Cuf2 sur l'expression de *wtf13*⁺ est observable dès 6 h suite à l'inactivation de Pat1^{ts}. En effet, dans un mutant *cuf2Δ/Δ*, l'expression d'un gène rapporteur lacZ fusionné au promoteur de *wtf13*⁺ demeure anormalement élevée à partir du temps 6 h (résultats non-publiés). Ces résultats supportent les résultats de ChIP (Cuf2 et pol II) puisqu'en théorie, le transcrit de lacZ ne peut pas être stabilisé par Meu5 et le mécanisme de régulation post-transcriptionnelle. L'ensemble de ces observations illustrent que lors des divisions méiotiques, des mécanismes de régulation transcriptionnelle (Cuf2) et post-transcriptionnelle (Meu5) agissent de façon concomitante mais opposée afin de promouvoir le bon niveau de transcrits de certains gènes intermédiaires au bon moment.

D'ailleurs, le transcrit de *fzr1*⁺, quant à lui, ne fait pas partie des 188 cibles stabilisées par Meu5 (Amorim *et al.*, 2010). Par conséquent, il apparaît cohérent que la régulation de son expression par Cuf2 corrèle parfaitement avec les résultats de ChIP (Cuf2 et pol II). De plus, lorsqu'on fusionne la région promotrice de *fzr1*⁺ à gène rapporteur lacZ, sa régulation en fonction du statut de Cuf2 (*cuf2Δ/Δ* vs *cuf2*^{+/+}) est pratiquement identique à celle du transcrit endogène de *fzr1*⁺ (résultats non-publiés). L'ensemble de ces données indiquent que Mei4, Cuf2 et Meu5, font parti d'un complexe réseau de régulation qui façonne différents profils d'expression de gènes intermédiaires afin que ceux-ci soient exprimés au niveau adéquat et au moment opportun lors des divisions méiotiques.

2.4. Récapitulation des données de la 2^e publication - 2^e partie

Avant la publication de nos résultats en 2016, différentes études avaient déjà dévoilés que l'expression de *fzr1*⁺ et de *wtf13*⁺ était dépendante de Mei4. En premier lieu, la comparaison du transcriptome de cellules méiotiques *mei4Δ/Δ* à celui de cellules *mei4*^{+/+} indiquait qu'en absence de Mei4, l'expression de ces deux gènes était réduite d'au moins deux fois (Mata *et al.*, 2007). Par la suite, une seconde étude montrait que dans un mutant *mei4Δ/Δ*, l'expression de *fzr1*⁺ était complètement abolie (Asakawa *et al.*, 2001).

Étant donné que l'expression de *fzr1*⁺ et de *wtf13*⁺ était vraisemblablement co-réglée par Cuf2 et Mei4, nous avons tenté de comprendre quelle était la relation entre ces deux facteurs de transcription (Ioannoni *et al.*, 2016). Pour ce faire, nous avons d'abord vérifié si l'expression de *fzr1*⁺ et de *wtf13*⁺ était bel et bien réglée par Mei4. Nos résultats montrent qu'en absence de Mei4, l'expression de *fzr1*⁺ est totalement abolie, tandis que l'expression de *wtf13*⁺ est réduite de plus de 90%. Ces résultats supportent que Mei4 est l'activateur principal de l'expression de *fzr1*⁺ et de *wtf13*⁺.

Afin de mieux comprendre par quel mécanisme Cuf2 contribuait à l'activation de *fzr1*⁺ et la répression de *wtf13*⁺, nous avons examiné la fonction de Cuf2 en absence de Mei4 (Ioannoni *et al.*, 2016). Pour ce faire, étant donné que l'expression de *cuf2*⁺ est aussi sous le contrôle de Mei4, nous avons intégré au génome d'une souche *mei4Δ/Δ* un allèle fonctionnel *cuf2*⁺-*TAP* sous le contrôle d'un promoteur inductible, soit celui du gène *nmt1*⁺. Nos résultats montrent qu'en absence de Mei4, Cuf2 n'a aucune influence ni sur l'induction de *fzr1*⁺, ni sur la répression de *wtf13*⁺. En effet, dans cette souche, le niveau de transcrits de *fzr1*⁺ demeure indétectable et celui de *wtf13*⁺ demeure également inchangé (~ 90% de réduction par rapport à une souche de type sauvage). De plus, nos résultats montrent qu'en absence de Mei4, Cuf2 n'est plus en mesure de s'associer aux promoteurs ni de *fzr1*⁺, ni de *wtf13*⁺. Ces résultats indiquent que Cuf2 nécessite la présence de Mei4 afin de réguler l'expression de *fzr1*⁺ et de *wtf13*⁺ ainsi que de s'associer à leur promoteur. À la lumière de ces résultats, nous avons évoqué la possibilité que Cuf2 et Mei4 interagissent physiquement afin de co-réguler l'expression de *fzr1*⁺ et de *wtf13*⁺.

Lors du cycle méiotique chez *S. pombe*, les systèmes protéolytiques endogènes deviennent hyperactifs, surtout suite au changement nutritionnel (i.e. suite à la carence d'azote) (Mukaiyama *et al.*, 2009, Mukaiyama *et al.*, 2010, Nakashima *et al.*, 2006). Ce mécanisme est essentiel afin que les protéines mitotiques, qui sont inutiles au cycle méiotique, soient rapidement dégradées et recyclées. De plus, étant donné que chez *S. pombe*, le cycle méiotique est déclenché par un manque d'azote et que ce nutriment constitue un élément essentiel à toute protéine, cette protéolyse hyperactive est aussi critique afin que la synthèse *de novo* soit assurée pendant tout le processus méiotique (Mukaiyama *et al.*, 2010).

Puisqu'il est généralement difficile de détecter des interactions protéine-protéine *in vivo*, principalement à cause du fait que les techniques employées requièrent un haut rendement protéique, nous avons employé un système méiotique alternatif afin de tester l'interaction entre Cuf2 et Mei4. Ce système, bien établi chez *S. pombe*, se base sur la surexpression de *mei4*⁺, qui est placé sous le contrôle d'un promoteur inductible afin d'être exprimé à partir de cellules végétatives (Mata *et al.*, 2007, Nakase *et al.*, 2009). Lorsque que l'expression de *mei4*⁺ est dérégulée, la protéine est surproduite et induit l'expression de la plupart de ses cibles, incluant *fzr1*⁺ et *wtf13*⁺, engendrant ainsi une méiose ectopique initiée à partir de la méiose I (Mata *et al.*, 2007, Nakase *et al.*, 2009).

À partir du système de surexpression de *mei4*⁺, nous avons développé des souches nous permettant de vérifier si Cuf2 et Mei4 interagissaient *in vivo* par co-immunoprécipitation (CoIP) et par complémentation par fluorescence bimoléculaire (BiFC) (Ioannoni *et al.*, 2016). En utilisant ces deux méthodes, nous avons observé que Cuf2 et Mei4 interagissent au noyau de cellules induites en méiose de manière ectopique. À ce moment, l'ensemble de nos résultats suggéraient que Mei4 et Cuf2 pouvaient interagir aux promoteurs de leurs cibles afin d'en co-réguler l'expression.

Afin de solidifier le concept que Mei4 et Cuf2 interagissaient ensemble et ce, possiblement au niveau de la chromatine, nous avons vérifié l'association de Cuf2 avec une version du promoteur de *fzr1*⁺ dans lequel nous avons identifié et muté deux séquences

FLEX putatives (Ioannoni *et al.*, 2016). Afin de confirmer que ces mutations avaient réellement un impact sur la fonctionnalité de ces séquences, l'association de Mei4 avec la version mutée de ce promoteur a également été testée. Lorsque les séquences FLEX putatives sont toutes les deux mutées, Mei4 et Cuf2 perdent la capacité de s'associer avec le promoteur de *fzr1*⁺, dont l'expression devient d'ailleurs abolie. Ces résultats indiquent que Cuf2 requiert la présence de séquences FLEX afin de pouvoir s'associer au promoteur de *fzr1*⁺. L'ensemble de ces résultats suggèrent fortement que Cuf2 et Mei4 interagissent au niveau promoteur de *fzr1*⁺ afin d'en co-activer son expression à la transition entre la MI et la MII.

Dans les prochains paragraphes, je ferai référence aux résultats exposés ci-haut afin de générer de nouvelles hypothèses de recherche et de proposer des expériences qui permettraient de les vérifier.

2.4.1. Liaison de Cuf2 à l'ADN et identification d'une séquence régulatrice

Nos résultats de ChIP montrent qu'*in vivo*, Cuf2 est associé aux promoteurs de *fzr1*⁺ et de *wtf13*⁺ (Ioannoni *et al.*, 2016). Étant donné que la procédure de ChIP comporte une étape de fixation au formaldéhyde qui provoque également des liens covalents protéine-protéine, cette technique ne permet pas de discriminer une protéine qui lie directement l'ADN d'une protéine qui s'associe à la chromatine via par exemple, une interaction protéique (Furey, 2012). Par conséquent, il demeure toujours incertain si Cuf2 établit ou non des contacts directs avec l'ADN au niveau des promoteurs de ses gènes cibles.

Afin de déterminer si Cuf2 lie l'ADN directement, un essai de rétention sur gel (mieux connu sous le nom d'*electrophoretic mobility shift assay*, ou EMSA) pourrait être mis de l'avant. Cette technique permet essentiellement de vérifier si une protéine possède la capacité de se lier à un fragment d'ADN *in vitro* (Fried et Crothers, 1981, Garner et Revzin, 1981). La procédure consiste d'abord à exprimer la protéine d'intérêt dans *Escherichia coli* (*E. coli*) pour ensuite la purifier (partiellement ou totalement) et l'incuber en présence d'un fragment d'ADN synthétique radiomarké (qui se situe généralement entre 50 et 200

nucléotides). Si le fragment possède une séquence qui permet à la protéine de s'y lier, le complexe ADN-protéine migrera beaucoup plus lentement que le fragment d'ADN non-lié sur un gel de polyacrylamide. La migration de la bande qui correspond au complexe est alors qualifiée de « retardée » par rapport à celle du fragment seul. Avec un anticorps dirigé contre la protéine ou contre une étiquette moléculaire qui est fusionnée à celle-ci, on peut ensuite s'assurer que cette bande correspond réellement au complexe ADN-protéine. Si tel est le cas, on peut ensuite introduire des mutations au nucléotide près dans le fragment d'ADN de manière à caractériser la séquence de liaison de la protéine d'intérêt. On peut également tester la capacité d'une séquence d'ADN à interagir avec différentes versions mutantes d'une protéine d'intérêt afin d'en caractériser, par exemple, le domaine de liaison à l'ADN (Smith et Humphries, 2009).

Ceci étant dit, il serait très instructif de pouvoir tester la liaison de Cuf2 à un fragment d'ADN par rétention sur gel. Étant donné que sa séquence de liaison demeure inconnue (en présumant que cette séquence existe), il serait judicieux de se tourner vers les résultats obtenus par ChIP. Sachant que l'association maximale de Cuf2 avec la chromatine se situe au niveau de régions qui comprennent des séquences FLEX et que ce motif s'est vu être essentiel pour la présence de Cuf2 au promoteur de *fzr1*⁺, il serait logique de vérifier si Cuf2 interagit avec des fragments d'ADN qui contiennent les séquences endogènes du promoteur de *fzr1*⁺ (de part et d'autre des séquences FLEX, en incluant le motif).

Si Cuf2 lie l'ADN directement, il est fort possible que son site de liaison se situe à proximité d'une séquence FLEX (étant donné que Cuf2 interagit avec Mei4, et que Mei4 lie directement ce motif). Si Cuf2 induisait un retard de migration sur gel, il serait alors fort intéressant de muter des segments de nucléotides adjacents au motif FLEX et de vérifier si la liaison de Cuf2 est conservée ou perdue. De cette façon, il serait possible de déterminer une séquence consensus putative et ensuite, de tester si cette séquence est fonctionnelle *in vivo* pour l'association de Cuf2 au promoteur de *fzr1*⁺. On aurait simplement à muter la séquence trouvée au niveau du promoteur de *fzr1*⁺ (au génome de la levure) et ensuite à vérifier par ChIP si on observe une diminution ou une perte de l'association de Cuf2 avec

la chromatine. En parallèle, il serait possible de vérifier l'expression de *fzr1*⁺ lorsque cette séquence est mutée afin de supporter les résultats obtenus par ChIP.

Dans l'éventualité où une séquence consensus était identifiée, il serait vraiment intéressant de vérifier si celle-ci est également retrouvée au niveau du promoteur des gènes dont l'expression est réprimée par Cuf2, tel que *wtf13*⁺. Si cette séquence était retrouvée dans la région promotrice qui corrèle avec l'enrichissement maximal de Cuf2, il serait alors fort intéressant de muter la séquence *in vivo* et de vérifier par ChIP si l'association de Cuf2 à la chromatine est maintenue, perdue ou diminuée. De telles données apporteraient des précisions quant au mécanisme moléculaire par lequel Cuf2 régule la transcription, à savoir si la séquence de liaison est identique ou différente en fonction l'activité de Cuf2 (e.g. répresseur vs activateur de la transcription). D'ailleurs, puisque Cuf2 possède un *AT-hook*, il est probable que la protéine puisse se lier à une séquence plus ou moins spécifique riche en nucléotides A/T située dans le sillon mineur de l'ADN. Cette prédiction, purement hypothétique, n'empêche en rien qu'une autre portion de Cuf2 pourrait établir des contacts directs avec une séquence de nucléotides plus rigide qui serait située dans le sillon majeur, en amont ou en aval de ces séquences AT-riches. Quoiqu'il en soit, de telles hypothèses pourraient être vérifiables par des essais de rétention sur gel et corroborées *in vivo* par des essais de ChIP. De plus, si une séquence consensus était identifiée avec succès, il serait fort intéressant de vérifier si celle-ci est également présente au niveau de la région promotrice de l'ensemble des gènes intermédiaires. De telles recherches pourraient mener à l'identification de nouvelles cibles potentielles qui pourraient être régulées par Cuf2, de la même façon que ce facteur de transcription stimule l'induction de *fzr1*⁺.

Par contre, si Cuf2 n'induisait par de retard sur gel, il serait alors intéressant d'ajouter Mei4 dans les réactions de liaison avec le fragment d'ADN. En effet, il demeure possible que Cuf2 s'associe au promoteur de *fzr1*⁺ indirectement, soit via son interaction avec Mei4. En combinant Cuf2 et Mei4, on pourrait possiblement observer un retard de migration qui impliquerait les deux facteurs puisqu'il a été démontré qu'*in vitro*, Mei4 est en mesure de lier une séquence FLEX. Pour ce faire, Cuf2 et Mei4 seraient fusionnées à étiquette moléculaire différente (par exemple, HA₄ et MBP) de sorte qu'il serait possible de

vérifier si les deux protéines sont présentes dans le même complexe ADN-protéines avec des anticorps spécifiques à chaque étiquette. Une réaction contrôle qui comprendrait le fragment d'ADN en présence de Mei4 seulement s'imposerait. Dans l'éventualité où Mei4 doit être ajoutée à la réaction afin d'observer une co-association de Cuf2 au même fragment d'ADN, on pourrait ensuite procéder à la même expérience avec un fragment dont les séquences FLEX ont été mutées. Cette réaction permettrait de confirmer que les deux protéines sont bel et bien associées au fragment grâce à la séquence FLEX. Dans son ensemble, peu importe le scénario qui découlerait des expériences de rétention sur gel, les résultats seraient très informatifs quant au mécanisme par lequel Cuf2 régule l'expression génique.

Nos résultats montrent que le motif FLEX est requis afin que Cuf2 puisse s'associer au promoteur de *fzr1⁺* *in vivo*. Considérant que ce motif soit directement lié par Mei4 et que Cuf2 ne possède aucune signature du domaine de liaison à l'ADN de type *winged-helix*, il y a très peu de chances que ce motif soit également directement lié par Cuf2. Malgré plusieurs efforts, nous n'avons pu identifier une séquence consensus qui permet à Cuf2 d'être présent au promoteur de ses cibles (si bien sûr, cette séquence existe réellement). Quoiqu'il en soit, basé sur les caractéristiques structurales de la protéine, il est beaucoup plus probable que Cuf2 établisse des contacts directs avec la chromatine via son propre site de liaison.

Dans cette optique, et dans l'éventualité où les essais de rétention sur gel seraient techniquement trop complexes ou irréalisables, il serait extrêmement informatif de procéder à une expérience de « ChIP-exo ». La méthodologie consiste d'abord à effectuer un ChIP standard pour ensuite digérer les fragments d'ADN immunoprécipités à l'exonucléase lambda (Rhee et Pugh, 2011). Cette enzyme digère exclusivement l'ADN non-encombré, c'est-à-dire au niveau de nucléotides qui ne sont pas protégés par des entités protéiques. Cette étape permet de raccourcir significativement la longueur des fragments immunoprécipités de sorte que les régions protégées correspondent pratiquement à la région liée par la protéine d'intérêt, à quelques dizaines de nucléotides près (25-50). Ces fragments protégés sont ensuite séquencés par une méthode à haut débit et analysés

informatiquement afin d'identifier un motif récurrent (Rhee et Pugh, 2011). L'étape de digestion à l'exonucléase favorise donc une meilleure sensibilité lors du séquençage mais surtout, elle permet d'identifier une séquence consensus putative avec un haut degré de confiance.

2.4.2. Identification du régulon de Cuf2

Mei4 active l'expression de la grande majorité des gènes intermédiaires en s'associant au motif FLEX dans leur région promotrice (Alves-Rodrigues *et al.*, 2016, Mata *et al.*, 2007, Moldon *et al.*, 2008). Étant donné que nos résultats indiquent que Cuf2 interagit avec Mei4 et que le motif FLEX est requis afin que Cuf2 puisse s'associer au promoteur de *fzr1*⁺, il est fort probable que Cuf2 participe à l'activation de plusieurs autres gènes intermédiaires. Puisque notre analyse du transcriptome des cellules *cuf2Δ/Δ* vs *cuf2*^{+/+} a été réalisée au temps 9 h, ces gènes cibles potentiels n'ont pu être identifiés.

Ceci étant dit, une expérience de ChIP-exo réalisée au temps 6 h suite à l'initiation du cycle méiotique permettrait fort probablement d'identifier plusieurs nouveaux gènes cibles de Cuf2. Étant donné que nos résultats suggèrent que Cuf2 s'associe systématiquement au promoteur de ses gènes cibles au temps 6 h, une telle expérience pourrait possiblement permettre l'identification de toutes les régions promotrices visées par Cuf2. Ensuite, on pourrait corroborer ces résultats à ceux d'une analyse du transcriptome de cellules *cuf2Δ/Δ* vs *cuf2*^{+/+} à 6 h après l'induction du cycle méiotique. De cette façon, le régulon réel de Cuf2, c'est-à-dire tous les gènes dont l'expression est directement régulée par le facteur de transcription, pourrait enfin être identifié.

2.4.3. Recrutement de Cuf2 à la chromatine et interaction avec Mei4

Malheureusement, nos résultats ne permettent pas de discriminer si l'interaction entre Cuf2 et Mei4 est dépendante ou non de leur association avec la chromatine (Ioannoni *et al.*, 2016). En effet, selon nos données, deux scénarios demeurent possibles : 1- Cuf2 et

Mei4 interagissent et forment un hétérodimère qui ensuite, s'associe à la chromatine ou 2-Mei4 seul s'associe d'abord à la chromatine et y recrute ensuite Cuf2.

Afin de répondre à cette interrogation, il serait vraiment intéressant de pouvoir générer un mutant de Mei4 dont l'activité de liaison à l'ADN serait brisée, mais dont la capacité à hétérodimériser avec Cuf2 serait conservée. La façon la plus probable d'obtenir un tel mutant serait en mutant un ou quelques résidus clés (se retrouvant au sein de son domaine N-terminal) permettant à Mei4 de lier l'ADN. Basé sur des alignements de séquence ainsi que sur la structure cristalline d'un facteur Fkh humain (e.g. HNF-3) lié à son substrat d'ADN, différents mutants pourraient être générés et ensuite testés afin d'en produire un avec le phénotype recherché (Horie *et al.*, 1998, Overdier *et al.*, 1994). Si un tel mutant était obtenu, le résultat en soi indiquerait que l'interaction entre Cuf2 et Mei4 est indépendante de leur capacité à s'associer avec la chromatine. Ces résultats sous-entendraient que chaque facteur possède intrinsèquement (au niveau de leur séquence protéique et des modifications post-traductionnelles qu'elles comportent, si tel est le cas) ce qui est nécessaire afin de produire une interaction protéine-protéine. Il serait alors tout-à-fait envisageable de réaliser des expériences visant à caractériser les domaines ou les acides aminés impliqués dans leur interaction.

Par contre, dans le cas où on serait incapable de générer un mutant de Mei4 qui ne lie plus la chromatine mais qui interagit toujours avec Cuf2, l'interprétation d'un tel échec serait plus difficile (puisque en soi, on ne peut rien conclure d'un résultat négatif). Si tel était le cas, on pourrait imaginer que les résidus responsables de la liaison à l'ADN sont également impliqués dans les contacts avec Cuf2. Encore plus probable, on pourrait penser que l'interaction entre Cuf2 et Mei4 est possible exclusivement lorsque les deux facteurs sont associés à la chromatine. Dans ce scénario, il serait fort probable que chacune de leur séquence de liaison soit située à proximité l'une de l'autre, recrutant chacune son facteur respectif, ce qui est bien sûr conditionnel à ce que Cuf2 puisse lier l'ADN directement via une séquence consensus. Cette avenue est quand même intéressante puisqu'elle constituerait une explication simple au fait que les deux facteurs de transcription co-régulent seulement un certain nombre commun de gènes intermédiaires. En effet, nos

résultats ont montré que Cuf2 et Mei4 co-activent l'expression de *fzr1*⁺ mais que par contre, exclusivement Mei4 s'associe au promoteur du gène intermédiaire *rem1*⁺ afin d'en activer l'expression. On pourrait imaginer qu'au promoteur de *fzr1*⁺, les séquences de liaison de Cuf2 et de Mei4 sont présentes à proximité l'une de l'autre tandis qu'au promoteur de *rem1*⁺, seulement la séquence de liaison de Mei4 est présente. Si tel était le cas, c'est-à-dire si Cuf2 possède également sa propre séquence de liaison, comment expliquer que Cuf2 nécessite absolument la présence de Mei4 afin de s'associer à la chromatine *in vivo*?

On pourrait imaginer que Mei4, en se liant à une séquence FLEX, induit un changement significatif dans l'intégrité de la chromatine de sorte que l'association locale des histones avec l'ADN est compromise. En effet, de nombreuses données établissent que les facteurs de type Fkh font parti d'une classe de facteurs de transcription qualifiés de « pionniers », c'est-à-dire qui sont en mesure de compétitionner contre les histones afin d'altérer l'architecture chromatinienne (Benayoun *et al.*, 2011, Zaret et Carroll, 2011). Ceci étant dit, il est fort concevable que la liaison de Mei4 à une séquence FLEX puisse provoquer l'exposition de séquences nucléotidiques environnantes qui étaient auparavant dissimulées par les histones. À son tour, un facteur de transcription tel que Cuf2 pourrait s'associer à sa séquence de liaison et par le fait même, interagir avec Mei4. Dans l'éventualité où au contraire, Mei4 et Cuf2 ont la capacité d'interagir physiquement avant même d'être associés à la chromatine, un mécanisme de cette nature demeure possible. En effet, Mei4 pourrait très bien établir un premier contact avec la chromatine tout en étant associé à Cuf2 et ensuite, induire les altérations chromatinienne nécessaires au contact de Cuf2 avec son propre élément de liaison à l'ADN.

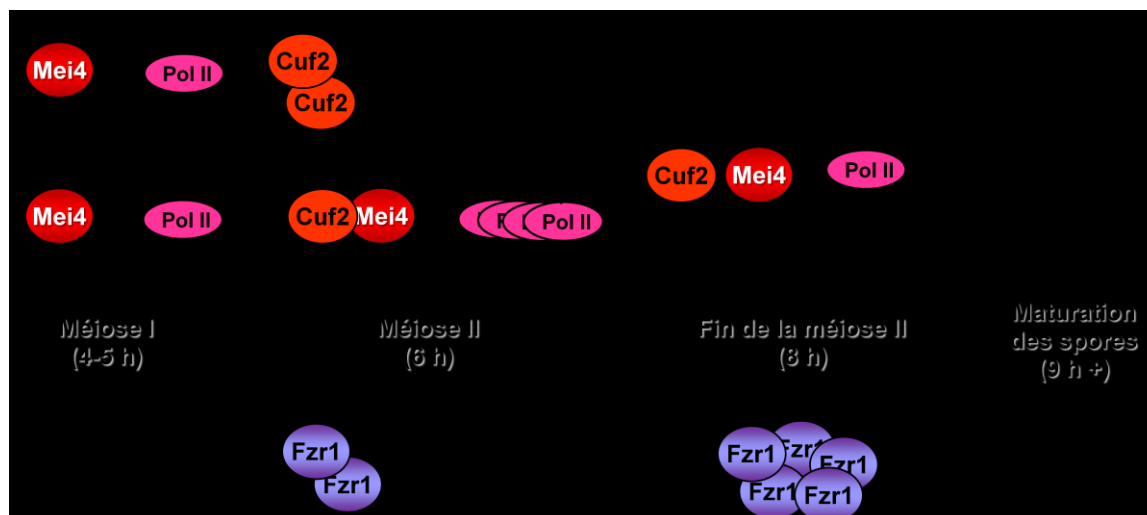


Figure 1. Modèle de régulation positive exercée par Cuf2 sur l'expression de *fzf1*⁺ et terminaison des divisions méiotiques. Lors des divisions méiotiques, Cuf2 interagit avec Mei4 et s'associe à une région spécifique du promoteur de *fzf1*⁺ (via le motif FLEX) afin d'en augmenter le niveau d'expression selon un mécanisme de nature transcriptionnelle (en régulant l'association de l'ARN polymérase II au niveau de la région transcrite de *fzf1*⁺). Cette régulation permet l'augmentation du niveau protéique de Fzf1, l'activation complète de l'APC et par conséquent, la terminaison des divisions méiotiques seulement une fois la MII complétée. Suite à la MII, selon un mécanisme de nature inconnue, les activateurs Cuf2 et Mei4 sont déplacées de la chromatine et l'expression de *fzf1*⁺ est abolie, ce qui coïncide avec le début de la maturation des spores (où l'expression de *fzf1*⁺ n'est plus requise dans la cellule).

2.4.4. Mécanisme par lequel Cuf2 régule la transcription

Nos résultats indiquent que Cuf2 influence la densité relative d'ARN polymérase II le long des régions transcrites de *fzf1*⁺ et de *wtfl3*⁺ (Ioannoni *et al.*, 2016). En effet, en absence de Cuf2, la densité d'ARN pol II est diminuée d'environ 40% le long de la région transcrite de *fzf1*⁺ tandis qu'elle est augmentée d'environ du même ordre de grandeur (38%) le long de la région transcrite de *wtfl3*⁺ à 6 h suite à l'initiation du cycle méiotique. L'amplitude de variation d'ARN pol II en fonction du statut de Cuf2 (*cuf2*Δ/Δ vs *cuf2*^{+/+}) corrèle bien avec l'effet qu'exerce Cuf2 sur l'expression des gènes *fzf1*⁺ et *wtfl3*⁺. Ces observations suggèrent que Cuf2 régule l'expression de *fzf1*⁺ et de *wtfl3*⁺ en influençant la densité relative d'ARN polymérase II le long de leur région transcrite. Or, le mécanisme

par lequel Cuf2 affecte la transcription de manière pol II-dépendante demeure totalement inconnu.

Étant donné que selon nos données, Cuf2 semble s'associer systématiquement à une région spécifique au sein du promoteur de ses gènes cibles (et non au niveau de leur région codante), on pourrait imaginer un modèle où Cuf2 régule le recrutement ou l'accessibilité de l'ARN pol II à la chromatine plutôt que sa processivité (e.g. sa capacité à transcrire de manière optimale et continue). Mais comment Cuf2 pourrait-il influencer la capacité de l'ARN pol II à avoir accès au promoteur de ses gènes cibles?

Simplement, on pourrait imaginer que Cuf2 influence (positivement ou négativement) le recrutement de l'ARN pol II en régulant Mei4 au niveau de sa capacité à entrer au noyau et/ou sa stabilité et/ou son affinité pour sa séquence de liaison (i.e. le motif FLEX). Afin de vérifier ces hypothèses, il serait vraiment intéressant de tester la localisation, le profil d'expression protéique ainsi que l'association de Mei4 *in vivo* à la chromatine en présence vs en absence de Cuf2. On pourrait imaginer qu'en absence de Cuf2, par exemple, l'association de Mei4 au promoteur de *fzr1*⁺ pourrait être réduite d'environ 40% à 6 h suite à l'induction du cycle méiotique. Un tel résultat pourrait expliquer la diminution de l'expression de *fzr1*⁺ ainsi que la réduction du niveau d'ARN pol II le long de sa région transcrite observée en absence Cuf2.

Chez *S. pombe*, Fkh2 est un des trois autres facteurs de transcription de type Fkh et réprime l'expression de différent groupes de gènes pendant la croissance végétative (Bahler, 2005). En effet, lors la transition M/G₁, plusieurs données indiquent que Fkh2 réprime l'expression d'une batterie de gènes associés à la progression de la mitose (Buck *et al.*, 2004, Bulmer *et al.*, 2004). Outre son rôle dans la répression de gènes mitotiques, de récentes études ont montré que Fkh2 réprime également l'expression de plusieurs gènes intermédiaires méiose-spécifiques via un mécanisme impliquant la transcription antisens. Même si le mécanisme demeure obscur, les résultats indiquent qu'en absence de Fkh2, l'expression de transcrits antisens le long des régions codantes de plusieurs gènes

intermédiaires est diminuée et par conséquent, l'expression de ces gènes (e.g. leurs transcrits sens) devient alors apparente lors de la croissance végétative (Chen *et al.*, 2012).

Une étude toute récente a montré que Fkh2 est également active lors de la phase S pré-méiotique et maintient la répression de plusieurs gènes intermédiaires de sorte à ce que leur expression ne soit induite qu'à partir des divisions méiotiques (Alves-Rodrigues *et al.*, 2016). En effet, leurs résultats montrent que Fkh2 réprime directement l'expression de plusieurs gènes intermédiaires en s'associant à leur promoteur via le motif FLEX. Notamment, les auteurs ont observé que la présence de Fkh2 à ces promoteurs stimule, par la suite, l'association de Mei4 à ces mêmes promoteurs à partir de la MI. En effet, leurs résultats indiquent que Fkh2 permet à Mei4 de reconnaître certains promoteurs auxquels elle doit s'associer afin d'induire l'expression des gènes correspondants lors des divisions méiotiques. Le mécanisme par lequel Mei4 remplace Fkh2 au niveau de ces promoteurs demeure obscur. Néanmoins, les résultats obtenus indiquent que l'association de Mei4 au niveau de promoteur de ces gènes intermédiaires au détriment de Fkh2 (via le motif FLEX) stimule le recrutement d'un complexe cycline-Cdk (e.g. Cig2-Cdk1) qui phosphoryle et inactive Fkh2. En effet, leurs résultats montrent qu'une fois phosphorylée au niveau de son domaine régulateur FHA, l'affinité de Fkh2 pour le motif FLEX diminue drastiquement et Mei4 devient le seul facteur de transcription capable de s'associer aux promoteurs de ces gènes intermédiaires.

Il s'avère que selon cette étude, *fzr1*⁺ fait partie des gènes qui subissent le mécanisme d'activation exercé par Fkh2/Mei4 (Alves-Rodrigues *et al.*, 2016). Or, étant donné que nos données indiquent que Cuf2 et Mei4 interagissent au promoteur de *fzr1*⁺ via le motif FLEX, il serait concevable que Cuf2 ait un rôle à jouer dans le mécanisme qui permet à Mei4 de remplacer Fkh2 au promoteur de *fzr1*⁺. Par exemple, Cuf2 pourrait être impliqué dans le recrutement du complexe Cig2-Cdk1 au promoteur de *fzr1*⁺ et par conséquent, stimuler l'association de Mei4 au motif FLEX en provoquant la phosphorylation de Fkh2. On peut également imaginer qu'un hétéro-complexe Cuf2-Mei4 pourrait avoir une plus grande affinité pour une séquence FLEX que Fkh2 seul, surtout si la séquence FLEX liée par Mei4 était bordée d'une séquence de liaison propre à Cuf2. Dans

ce contexte, l'expérience qui consisterait à vérifier l'association de Mei4 *in vivo* au promoteur de *fzr1*⁺ en absence vs en présence de Cuf2 devient extrêmement intéressante. Si en absence de Cuf2, l'association de Mei4 au promoteur de *fzr1*⁺ était réduite, alors il serait concevable que Cuf2 soit réellement impliquée dans le mécanisme impliquant Fkh2 et/ou Cig2-Cdk1 pour l'activation Mei4-dépendante de l'expression de *fzr1*⁺.

Ceci étant dit, il demeure possible que Cuf2 exerce un effet davantage direct sur la transcription, en influençant lui-même le recrutement de l'ARN pol II (et non via un effet qui passe par Mei4). Cuf2 pourrait par exemple altérer la structure de la chromatine via son motif *AT-hook* en induisant une courbure dans la structure chromatinienne de sorte à favoriser l'interaction entre certaines sous-unités de l'ARN pol II et d'autres facteurs qui permettent leur recrutement. En effet, mis à part Mei4, il n'est pas impossible que Cuf2 puisse interagir avec d'autres partenaires protéiques. Par exemple, Cuf2 pourrait interagir directement avec des enzymes qui modifient l'intégrité de la chromatine tels que des histones acétylases (HAT) et des hélicases (dans le cas d'une activation de la transcription) ou des histones déacétylases (HDAC) ou méthylases (dans les cas d'une répression) et favoriser leur recrutement de sorte à influencer la transcription. D'ailleurs, lors des divisions méiotiques, divers gènes codant pour des HATs et des HDACs sont induits (Mata *et al.*, 2002). On pourrait donc imaginer que ces enzymes soient recrutées de manière Cuf2-dépendante afin de réguler (positivement ou négativement) la transcription des gènes cibles de Cuf2. En ce sens, il serait vraiment intéressant de procéder à une expérience d'immunoprécipitation de Cuf2, suivie d'une analyse des partenaires protéiques co-immunoprécipités par spectrométrie de masse. De cette façon, il serait possible d'identifier de nouveaux partenaires qui interagissent avec Cuf2 lors des divisions méiotiques. Ces données pourraient ensuite être utilisées afin d'investiguer le mécanisme par lequel Cuf2 régule la transcription chez *S. pombe*.

Les résultats des expériences de ChIP-exo et d'analyse du transcriptome de cellules *cuf2*Δ/Δ vs *cuf2*^{+/+} réalisées à 6 h suite à l'induction du cycle méiotique pourraient fournir de bons indices quant au mécanisme d'action par lequel Cuf2 régule la transcription. En effet, il serait intéressant de comparer le régulon de Cuf2 identifié grâce à ces techniques

aux résultats obtenus de l'étude du mécanisme d'activation des gènes intermédiaires par Fkh2/Mei4. Si Cuf2 était impliquée dans ce mécanisme, il y aurait alors probablement une corrélation entre les gènes cibles de Cuf2 et les gènes intermédiaires qui subissent une activation Fkh2/Mei4-dépendante. De plus, si une séquence consensus de liaison était identifiée pour Cuf2, il serait facile de vérifier si cette séquence se retrouverait systématiquement à proximité des séquences FLEX des gènes intermédiaires régulés par le mécanisme d'activation Fkh2/Mei4. Ces données supporteraient un modèle dans lequel Cuf2 favorise l'association de Mei4 aux séquences FLEX de plusieurs gènes intermédiaires au détriment de Fkh2 lors de la MI.

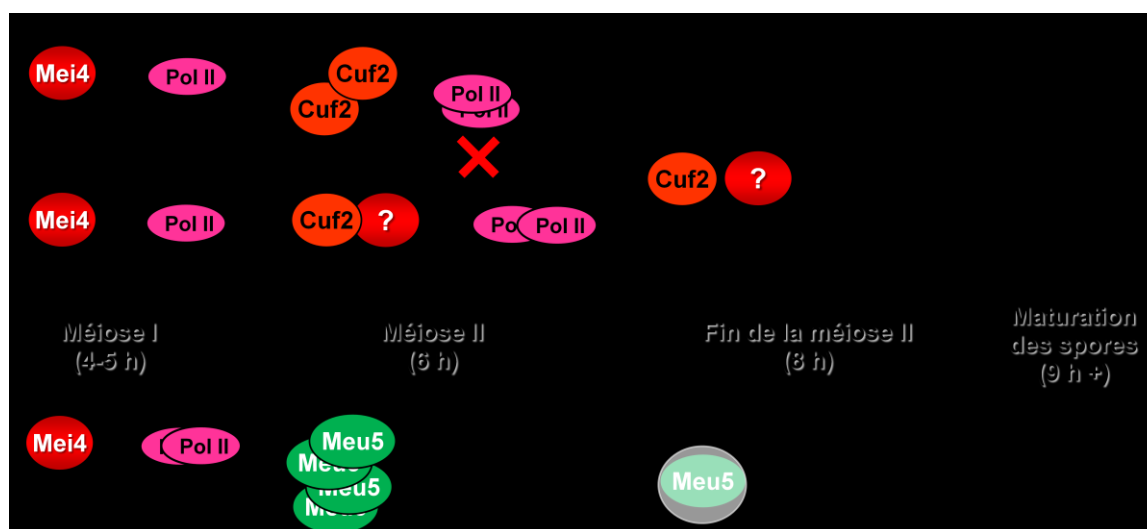


Figure 2. Modèle par lequel Cuf2 réprime l'expression du gène *wtf13*⁺ et régulation des gènes intermédiaires. Lors des divisions méiotiques, Cuf2 s'associe au promoteur de *wtf13*⁺ afin d'en réduire le niveau d'expression selon un mécanisme de nature transcriptionnelle (en régulant l'association de l'ARN polymérase II au niveau de la région transcrite de *wtf13*⁺). En parallèle, Meu5 s'associe au transcrit de *wtf13*⁺ afin de la stabiliser de sorte que l'effet exercé par Cuf2 sur l'expression de *wtf13*⁺ ne devient apparente qu'au terme des divisions méiotiques. Par un mécanisme toujours inconnu, l'association de Cuf2 au promoteur de *wtf13*⁺ est perdue suite aux divisions méiotiques. Cet événement coïncide avec le début de la maturation des spores. Les déterminants moléculaires qui permettent à Cuf2 de s'associer au promoteur de *wtf13*⁺ demeurent inconnus.

2.4.5. Fonction antagoniste de Cuf2 sur la transcription

Nos résultats de ChIP indiquent que Mei4 active également l'expression de *wtf13*⁺ de manière directe lors des divisions méiotiques (résultats non-publiés). Bien que nos données indiquent que le motif FLEX soit requis afin que Cuf2 puisse participer à l'induction de *fzr1*⁺, il demeure incertain si ce motif est également impliqué dans la répression Cuf2-dépendante de l'expression de *wtf13*⁺. Afin de répondre à cette question, il serait vraiment intéressant de muter les trois séquences FLEX putatives identifiées dans la région promotrice de *wtf13*⁺ et de vérifier si l'association de Cuf2 et de Mei4 à ce promoteur est maintenue ou perdue. Dans l'éventualité où l'association de Cuf2 et de Mei4 au promoteur de *wtf13*⁺ serait perdue, ces observations, normalement, pourraient suggérer que Cuf2 et Mei4 interagissent au promoteur de *wtf13*⁺ mais que dans ce cas-ci, Cuf2 régulerait négativement l'activité de Mei4 afin de réprimer l'expression de *wtf13*⁺. À ce point, le mécanisme par lequel Cuf2 pourrait influencer négativement l'expression d'un gène cible (*wtf13*⁺) et positivement l'expression d'un autre (*fzr1*⁺) via le même partenaire d'interaction à deux promoteurs différents serait difficilement explicable. Des données découlant de différentes expériences supplémentaires seraient nécessaires afin de générer une hypothèse de recherche logique.

Par contre, il n'est pas impossible que même si Cuf2 et Mei4 interagissent au promoteur de certains gènes cibles, tel que *fzr1*⁺, Cuf2 puisse également interagir avec d'autres facteurs de type Fkh au promoteur de gènes cibles autres, tel que celui de *wtf13*⁺. Les résultats d'une immunoprécipitation de Cuf2 suivie d'une analyse par spectrométrie de masse deviendraient alors très informatifs afin de pouvoir confirmer ou infirmer une telle possibilité.

Hypothétiquement, il ne serait pas impossible de découvrir que Cuf2 puisse également interagir avec Fkh2 lors des divisions méiotiques. On pourrait imaginer un modèle où, au début des divisions méiotiques, Mei4 se lie au promoteur de *wtf13*⁺ via le motif FLEX sans avoir la nécessité de déplacer Fkh2. Cette possibilité est réelle puisque selon les résultats obtenus de l'étude discutée plus haut, *wtf13*⁺ ne semble pas faire parti des gènes dont l'expression est réprimée par Fkh2 lors de la phase S pré-méiotique (Alves-Rodrigues *et al.*, 2016). De plus, nos propres résultats montrent que l'association maximale

de Mei4 avec le promoteur de *wtf13*⁺ est plutôt aux temps 4 et 5 h suite à l'induction du cycle méiotique tandis qu'à partir de 6 h, son association avec ce promoteur diminue déjà (résultats non-publiés). Par conséquent, il est possible qu'au temps 6 h, un complexe Cuf2-Fkh2 puisse venir déplacer Mei4 pour s'associer physiquement au promoteur de *wtf13*⁺.

Pour que Cuf2 puisse interagir physiquement avec Mei4 et Fkh2 et promouvoir l'association d'un complexe au détriment de l'autre à divers promoteurs (e.g. *fzr1*⁺ vs *wtf13*⁺), on pourrait imaginer que lors des divisions méiotiques, il existe deux formes de Cuf2, soit une phosphorylée et l'autre non. La forme phosphorylée pourrait par exemple avoir une conformation qui provoque son association avec Mei4 tandis que la forme non-phosphorylée pourrait adopter une conformation qui stimule son association avec Fkh2. Les complexes Cuf2-Mei4 et Cuf2-Fkh2 auraient donc probablement des structures tertiaires relativement différentes. Par conséquent, on pourrait imaginer que chaque complexe pourrait s'associer à des promoteurs différents dépendamment de la distance entre leurs séquences de liaisons respectives. Par exemple, un complexe Cuf2-Mei4 pourrait s'associer à un promoteur lorsqu'une séquence FLEX et la séquence de liaison de Cuf2 sont distancés de 4 nucléotides tandis qu'un complexe Cuf2-Fkh2 s'associerait aux mêmes séquences si celles-ci étaient séparées de 6 nucléotides. Quoique purement hypothétiques, de telles observations pourraient expliquer comment Cuf2 réussit à réguler positivement et négativement au même moment (i.e. au temps 6 h) l'expression d'une multitude de gènes intermédiaires lors du cycle méiotique chez *S. pombe*.

CONCLUSION

Au début de mes études graduées, la nature du rôle de Cuf2 chez *S. pombe* ainsi que son mécanisme d'action étaient totalement obscurs. Le travail effectué lors de mon cheminement a permis de mettre la lumière sur ce rôle et de comprendre une partie de son mécanisme d'action. Mes résultats ont dévoilé que Cuf2 est un facteur de transcription méiose-spécifique qui régule l'expression d'une multitude de gènes intermédiaires via leur promoteur et grâce à une interaction physique avec un deuxième facteur de transcription méiose-spécifique clé, soit Mei4. Le rôle de Cuf2 est critique puisqu'en son absence, le cycle méiotique et la sporulation sont toutes deux anormales. En effet, en absence de Cuf2, une troisième division méiotique aberrante survient et la formation de la membrane des spores ainsi que la maturation des ascospores présentent différentes anomalies qui se répercutent sur leur viabilité. L'ensemble de mes observations et résultats illustrent la grande importance de Cuf2 et de la présence de vastes et complexes réseaux de régulation qui permettent l'expression ordonnée et précise de différents gènes lors d'un programme de différenciation vital telle que la sporulation chez *S. pombe*.

REMERCIEMENTS

Je voudrais particulièrement remercier mon directeur de recherche, le professeur Simon Labbé, ainsi que tous ceux qui ont eu un impact de loin ou de proche sur mon cheminement et sur l'avancement de mes travaux, en particulier monsieur Jude Beaudoin, le professionnel de recherche du laboratoire. Je voudrais également remercier tous les étudiants gradués et stagiaires qui ont évolué au laboratoire (*alumni* et présents), en particulier Alexandre Mercier et Ariane Brault, qui ont significativement contribué aux manuscrits publiés, ainsi que tous mes amis, famille et autres proches qui m'ont supporté à travers mon cursus universitaire. Finalement, je voudrais remercier les membres du jury d'avoir accepté d'évaluer cette thèse ainsi que les différents organismes subventionnaires ayant supporté financièrement mes travaux de recherche.

LISTE DES RÉFÉRENCES

- Abe H, Shimoda C (2000) Autoregulated expression of *Schizosaccharomyces pombe* meiosis-specific transcription factor Mei4 and a genome-wide search for its target genes. *Genetics* 154(4): 1497-508.
- Alves-Rodrigues I, Ferreira PG, Moldon A, Vivancos AP, Hidalgo E, Guigo R, *et al.* (2016) Spatiotemporal Control of Forkhead Binding to DNA Regulates the Meiotic Gene Expression Program. *Cell Rep* 14(4): 885-95.
- Amorim MJ, Cotobal C, Duncan C, Mata J (2010) Global coordination of transcriptional control and mRNA decay during cellular differentiation. *Mol Syst Biol* 6(380).
- Anandhakumar J, Fauquenoy S, Materne P, Migeot V, Hermand D (2013) Regulation of entry into gametogenesis by Ste11: the endless game. *Biochem Soc Trans* 41(6): 1673-8.
- Aoi Y, Arai K, Miyamoto M, Katsuta Y, Yamashita A, Sato M, *et al.* (2013) Cuf2 boosts the transcription of APC/C activator Fzr1 to terminate the meiotic division cycle. *EMBO Rep* 14(6): 553-60.
- Aono T, Yanai H, Miki F, Davey J, Shimoda C (1994) Mating pheromone-induced expression of the *mat1-Pm* gene of *Schizosaccharomyces pombe*: identification of signalling components and characterization of upstream controlling elements. *Yeast* 10(6): 757-70.
- Arata M, Sato M, Yamashita A, Yamamoto M (2014) The RNA-binding protein Spo5 promotes meiosis II by regulating cyclin Cdc13 in fission yeast. *Genes Cells* 19(3): 225-38.
- Aravind L, Watanabe H, Lipman DJ, Koonin EV (2000) Lineage-specific loss and divergence of functionally linked genes in eukaryotes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(21): 11319-24.
- Asakawa H, Kitamura K, Shimoda C (2001) A novel Cdc20-related WD-repeat protein, Fzr1, is required for spore formation in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Genet Genomics* 265(3): 424-35.
- Bahler J (2005) Cell-cycle control of gene expression in budding and fission yeast. *Annu Rev Genet* 39(69-94).

Bahler J, Schuchert P, Grimm C, Kohli J (1991) Synchronized meiosis and recombination in fission yeast: observations with *pat1-114* diploid cells. *Curr Genet* 19(6): 445-51.

Beach D, Durkacz B, Nurse P (1982) Functionally homologous cell cycle control genes in budding and fission yeast. *Nature* 300(5894): 706-9.

Beach D, Rodgers L, Gould J (1985) *ran1*⁺ controls the transition from mitotic division to meiosis in fission yeast. *Curr Genet* 10(4): 297-311.

Beaudoin J, Ekici S, Daldal F, Ait-Mohand S, Guerin B, Labbe S (2013) Copper transport and regulation in *Schizosaccharomyces pombe*. *Biochem Soc Trans* 41(6): 1679-86.

Beaudoin J, Labbe S (2001) The fission yeast copper-sensing transcription factor Cuf1 regulates the copper transporter gene expression through an Ace1/Amt1-like recognition sequence. *J Biol Chem* 276(18): 15472-80.

Beaudoin J, Labbe S (2006) Copper induces cytoplasmic retention of fission yeast transcription factor Cuf1. *Eukaryot Cell* 5(2): 277-92.

Beaudoin J, Labbe S (2007) Crm1-mediated nuclear export of the *Schizosaccharomyces pombe* transcription factor Cuf1 during a shift from low to high copper concentrations. *Eukaryot Cell* 6(5): 764-75.

Beaudoin J, Mercier A, Langlois R, Labbe S (2003) The *Schizosaccharomyces pombe* Cuf1 is composed of functional modules from two distinct classes of copper metalloregulatory transcription factors. *J Biol Chem* 278(16): 14565-77.

Bellemare DR, Shaner L, Morano KA, Beaudoin J, Langlois R, Labbe S (2002) Ctr6, a vacuolar membrane copper transporter in *Schizosaccharomyces pombe*. *J Biol Chem* 277(48): 46676-86.

Benayoun BA, Caburet S, Veitia RA (2011) Forkhead transcription factors: key players in health and disease. *Trends Genet* 27(6): 224-32.

Benito J, Martin-Castellanos C, Moreno S (1998) Regulation of the G1 phase of the cell cycle by periodic stabilization and degradation of the p25^{rum1} CDK inhibitor. *EMBO J* 17(2): 482-97.

- Blanco MA, Pelloquin L, Moreno S (2001) Fission yeast *mfr1*⁺ activates APC and coordinates meiotic nuclear division with sporulation. *J Cell Sci* 114(Pt 11): 2135-43.
- Buck V, Ng SS, Ruiz-Garcia AB, Papadopoulou K, Bhatti S, Samuel JM, *et al.* (2004) Fkh2p and Sep1p regulate mitotic gene transcription in fission yeast. *J Cell Sci* 117(Pt 23): 5623-32.
- Bueno A, Russell P (1993) Two fission yeast B-type cyclins, Cig2 and Cdc13, have different functions in mitosis. *Mol Cell Biol* 13(4): 2286-97.
- Bulmer R, Pic-Taylor A, Whitehall SK, Martin KA, Millar JB, Quinn J, *et al.* (2004) The forkhead transcription factor Fkh2 regulates the cell division cycle of *Schizosaccharomyces pombe*. *Eukaryot Cell* 3(4): 944-54.
- Carpy A, Krug K, Graf S, Koch A, Popic S, Hauf S, *et al.* (2014) Absolute proteome and phosphoproteome dynamics during the cell cycle of *Schizosaccharomyces pombe* (Fission Yeast). *Mol Cell Proteomics* 13(8): 1925-36.
- Chen D, Toone WM, Mata J, Lyne R, Burns G, Kivinen K, *et al.* (2003) Global transcriptional responses of fission yeast to environmental stress. *Mol Biol Cell* 14(1): 214-29.
- Chen HM, Rosebrock AP, Khan SR, Futcher B, Leatherwood JK (2012) Repression of meiotic genes by antisense transcription and by Fkh2 transcription factor in *Schizosaccharomyces pombe*. *PLoS One* 7(1): e29917.
- Chikashige Y, Ding DQ, Funabiki H, Haraguchi T, Mashiko S, Yanagida M, *et al.* (1994) Telomere-led premeiotic chromosome movement in fission yeast. *Science* 264(5156): 270-3.
- Chikashige Y, Tsutsumi C, Yamane M, Okamasa K, Haraguchi T, Hiraoka Y (2006) Meiotic proteins bqt1 and bqt2 tether telomeres to form the bouquet arrangement of chromosomes. *Cell* 125(1): 59-69.
- Chikashige Y, Yamane M, Okamasa K, Mori C, Fukuta N, Matsuda A, *et al.* (2014) Chromosomes rein back the spindle pole body during horsetail movement in fission yeast meiosis. *Cell Struct Funct* 39(2): 93-100.

Cooke HJ, Saunders PT (2002) Mouse models of male infertility. *Nat Rev Genet* 3(10): 790-801.

Coudreuse D, van Bakel H, Dewez M, Soutourina J, Parnell T, Vandenhoute J, *et al.* (2010) A gene-specific requirement of RNA polymerase II CTD phosphorylation for sexual differentiation in *S. pombe*. *Curr Biol* 20(12): 1053-64.

Cromie G, Smith GR (2008) Meiotic Recombination in *Schizosaccharomyces pombe*: A Paradigm for Genetic and Molecular Analysis. *Genome Dyn Stab* 3(195).

Cross FR, Buchler NE, Skotheim JM (2011) Evolution of networks and sequences in eukaryotic cell cycle control. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 366(1584): 3532-44.

Cunliffe L, White S, McInerny CJ (2004) DSC1-MCB regulation of meiotic transcription in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Genet Genomics* 271(1): 60-71.

Dameron CT, Winge DR, George GN, Sansone M, Hu S, Hamer D (1991) A copper-thiolate polynuclear cluster in the *ACE1* transcription factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88(14): 6127-31.

Dancis A, Yuan DS, Haile D, Askwith C, Eide D, Moehle C, *et al.* (1994) Molecular characterization of a copper transport protein in *S. cerevisiae*: an unexpected role for copper in iron transport. *Cell* 76(2): 393-402.

Degols G, Shiozaki K, Russell P (1996) Activation and regulation of the Spc1 stress-activated protein kinase in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Cell Biol* 16(6): 2870-7.

Ding R, Smith GR (1998) Global control of meiotic recombination genes by *Schizosaccharomyces pombe rec16 (rep1)*. *Mol Gen Genet* 258(6): 663-70.

Duncan CD, Mata J (2014) The translational landscape of fission-yeast meiosis and sporulation. *Nat Struct Mol Biol* 21(7): 641-7.

Egel R (1973) Genes involved in mating type expression of fission yeast. *Mol Gen Genet* 122(4): 339-43.

Egel R. The molecular biology of *Schizosaccharomyces pombe* : genetics, genomics, and beyond. Berlin ; New York: Springer; 2004. xxviii, p. p.450

- Egel R, Egel-Mitani M (1974) Premeiotic DNA synthesis in fission yeast. *Exp Cell Res* 88(1): 127-34.
- Fantes P (1989) Yeast cell cycle. *Curr Opin Cell Biol* 1(2): 250-5.
- Farrell RA, Thorvaldsen JL, Winge DR (1996) Identification of the Zn(II) site in the copper-responsive yeast transcription factor, AMT1: a conserved Zn module. *Biochemistry* 35(5): 1571-80.
- Fisher D, Nurse P (1995) Cyclins of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Semin Cell Biol* 6(2): 73-8.
- Forsburg SL (2005) The yeasts *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe*: models for cell biology research. *Gravit Space Biol Bull* 18(2): 3-9.
- Forsburg SL, Nurse P (1991) Cell cycle regulation in the yeasts *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe*. *Annu Rev Cell Biol* 7(227-56).
- Fried M, Crothers DM (1981) Equilibria and kinetics of lac repressor-operator interactions by polyacrylamide gel electrophoresis. *Nucleic Acids Res* 9(23): 6505-25.
- Furey TS (2012) ChIP-seq and beyond: new and improved methodologies to detect and characterize protein-DNA interactions. *Nat Rev Genet* 13(12): 840-52.
- Garcia I, Tajadura V, Martin V, Toda T, Sanchez Y (2006) Synthesis of alpha-glucans in fission yeast spores is carried out by three alpha-glucan synthase paralogues, Mok12p, Mok13p and Mok14p. *Mol Microbiol* 59(3): 836-53.
- Garner MM, Revzin A (1981) A gel electrophoresis method for quantifying the binding of proteins to specific DNA regions: application to components of the *Escherichia coli* lactose operon regulatory system. *Nucleic Acids Res* 9(13): 3047-60.
- Gillett ES, Espelin CW, Sorger PK (2004) Spindle checkpoint proteins and chromosome-microtubule attachment in budding yeast. *J Cell Biol* 164(4): 535-46.
- Graden JA, Posewitz MC, Simon JR, George GN, Pickering IJ, Winge DR (1996) Presence of a copper(I)-thiolate regulatory domain in the copper-activated transcription factor Amt1. *Biochemistry* 35(46): 14583-9.

Handel MA, Schimenti JC (2010) Genetics of mammalian meiosis: regulation, dynamics and impact on fertility. *Nat Rev Genet* 11(2): 124-36.

Harigaya Y, Tanaka H, Yamanaka S, Tanaka K, Watanabe Y, Tsutsumi C, *et al.* (2006) Selective elimination of messenger RNA prevents an incidence of untimely meiosis. *Nature* 442(7098): 45-50.

Harigaya Y, Yamamoto M (2007) Molecular mechanisms underlying the mitosis-meiosis decision. *Chromosome Res* 15(5): 523-37.

Hayles J, Nurse P (1992) Genetics of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Annu Rev Genet* 26(373-402).

Hedges SB (2002) The origin and evolution of model organisms. *Nat Rev Genet* 3(11): 838-49.

Hibbett DS, Binder M, Bischoff JF, Blackwell M, Cannon PF, Eriksson OE, *et al.* (2007) A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycol Res* 111(Pt 5): 509-47.

Higuchi T, Watanabe Y, Yamamoto M (2002) Protein kinase A regulates sexual development and gluconeogenesis through phosphorylation of the Zn finger transcriptional activator Rst2p in fission yeast. *Mol Cell Biol* 22(1): 1-11.

Hoffman CS, Winston F (1991) Glucose repression of transcription of the *Schizosaccharomyces pombe fbp1⁺* gene occurs by a cAMP signaling pathway. *Genes Dev* 5(4): 561-71.

Hoffman CS, Wood V, Fantes PA (2015) An Ancient Yeast for Young Geneticists: A Primer on the *Schizosaccharomyces pombe* Model System. *Genetics* 201(2): 403-23.

Hogarth CA, Griswold MD (2010) The key role of vitamin A in spermatogenesis. *J Clin Invest* 120(4): 956-62.

Horie S, Watanabe Y, Tanaka K, Nishiwaki S, Fujioka H, Abe H, *et al.* (1998) The *Schizosaccharomyces pombe mei4⁺* gene encodes a meiosis-specific transcription factor containing a forkhead DNA-binding domain. *Mol Cell Biol* 18(4): 2118-29.

- Hu S, Furst P, Hamer D (1990) The DNA and Cu binding functions of *ACE1* are interdigitated within a single domain. *New Biol* 2(6): 544-55.
- Hughes DA, Yabana N, Yamamoto M (1994) Transcriptional regulation of a Ras nucleotide-exchange factor gene by extracellular signals in fission yeast. *J Cell Sci* 107 (Pt 12)(3635-42.
- Huth JR, Bewley CA, Nissen MS, Evans JN, Reeves R, Gronenborn AM, *et al.* (1997) The solution structure of an HMG-I(Y)-DNA complex defines a new architectural minor groove binding motif. *Nat Struct Biol* 4(8): 657-65.
- Iino Y, Yamamoto M (1985) Negative control for the initiation of meiosis in *Schizosaccharomyces pombe*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82(8): 2447-51.
- Ioannoni R, Beaudoin J, Lopez-Maury L, Codlin S, Bahler J, Labbe S (2012) Cuf2 is a novel meiosis-specific regulatory factor of meiosis maturation. *PLoS One* 7(4): e36338.
- Ioannoni R, Beaudoin J, Mercier A, Labbe S (2010) Copper-dependent trafficking of the Ctr4-Ctr5 copper transporting complex. *PLoS One* 5(8): e11964.
- Ioannoni R, Brault A, Labbe S (2016) Cuf2 Is a Transcriptional Co-Regulator that Interacts with Mei4 for Timely Expression of Middle-Phase Meiotic Genes. *PLoS One* 11(3): e0151914.
- Izawa D, Goto M, Yamashita A, Yamano H, Yamamoto M (2005) Fission yeast Mes1p ensures the onset of meiosis II by blocking degradation of cyclin Cdc13p. *Nature* 434(7032): 529-33.
- Jensen LT, Winge DR (1998) Identification of a copper-induced intramolecular interaction in the transcription factor Mac1 from *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J* 17(18): 5400-8.
- Jungmann J, Reins HA, Lee J, Romeo A, Hassett R, Kosman D, *et al.* (1993) MAC1, a nuclear regulatory protein related to Cu-dependent transcription factors is involved in Cu/Fe utilization and stress resistance in yeast. *EMBO J* 12(13): 5051-6.
- Kaestner KH, Knochel W, Martinez DE (2000) Unified nomenclature for the winged helix/forkhead transcription factors. *Genes Dev* 14(2): 142-6.

- Kanoh J, Watanabe Y, Ohsugi M, Iino Y, Yamamoto M (1996) *Schizosaccharomyces pombe* *gad7⁺* encodes a phosphoprotein with a bZIP domain, which is required for proper G1 arrest and gene expression under nitrogen starvation. *Genes Cells* 1(4): 391-408.
- Kaplan JH, Maryon EB (2016) How Mammalian Cells Acquire Copper: An Essential but Potentially Toxic Metal. *Biophys J* 110(1): 7-13.
- Karin M, Smeal T (1992) Control of transcription factors by signal transduction pathways: the beginning of the end. *Trends Biochem Sci* 17(10): 418-22.
- Kashiwazaki J, Nakamura T, Iwaki T, Takegawa K, Shimoda C (2005) A role for fission yeast Rab GTPase Ypt7p in sporulation. *Cell Struct Funct* 30(2): 43-9.
- Kashiwazaki J, Yamasaki Y, Itadani A, Teraguchi E, Maeda Y, Shimoda C, *et al.* (2011) Endocytosis is essential for dynamic translocation of a syntaxin 1 orthologue during fission yeast meiosis. *Mol Biol Cell* 22(19): 3658-70.
- Kelly M, Burke J, Smith M, Klar A, Beach D (1988) Four mating-type genes control sexual differentiation in the fission yeast. *EMBO J* 7(5): 1537-47.
- Kim AM, Vogt S, O'Halloran TV, Woodruff TK (2010) Zinc availability regulates exit from meiosis in maturing mammalian oocytes. *Nat Chem Biol* 6(9): 674-81.
- Kim BE, Nevitt T, Thiele DJ (2008) Mechanisms for copper acquisition, distribution and regulation. *Nat Chem Biol* 4(3): 176-85.
- Kimata Y, Kitamura K, Fenner N, Yamano H (2011) Mes1 controls the meiosis I to meiosis II transition by distinctly regulating the anaphase-promoting complex/cyclosome coactivators Fzr1/Mfr1 and Slp1 in fission yeast. *Mol Biol Cell* 22(9): 1486-94.
- Kimata Y, Trickey M, Izawa D, Gannon J, Yamamoto M, Yamano H (2008) A mutual inhibition between APC/C and its substrate Mes1 required for meiotic progression in fission yeast. *Dev Cell* 14(3): 446-54.
- Kitamura K, Katayama S, Dhut S, Sato M, Watanabe Y, Yamamoto M, *et al.* (2001) Phosphorylation of Mei2 and Ste11 by Pat1 kinase inhibits sexual differentiation via ubiquitin proteolysis and 14-3-3 protein in fission yeast. *Dev Cell* 1(3): 389-99.

Kjaerulff S, Andersen NR, Borup MT, Nielsen O (2007) Cdk phosphorylation of the Ste11 transcription factor constrains differentiation-specific transcription to G1. *Genes Dev* 21(3): 347-59.

Kjaerulff S, Lautrup-Larsen I, Truelsen S, Pedersen M, Nielsen O (2005) Constitutive activation of the fission yeast pheromone-responsive pathway induces ectopic meiosis and reveals *ste11⁺* as a mitogen-activated protein kinase target. *Mol Cell Biol* 25(5): 2045-59.

Knight SA, Labbe S, Kwon LF, Kosman DJ, Thiele DJ (1996) A widespread transposable element masks expression of a yeast copper transport gene. *Genes Dev* 10(15): 1917-29.

Knutsen JH, Rein ID, Rothe C, Stokke T, Grallert B, Boye E (2011) Cell-cycle analysis of fission yeast cells by flow cytometry. *PLoS One* 6(2): e17175.

Koch KA, Pena MM, Thiele DJ (1997) Copper-binding motifs in catalysis, transport, detoxification and signaling. *Chem Biol* 4(8): 549-60.

Kunitomo H, Higuchi T, Iino Y, Yamamoto M (2000) A zinc-finger protein, Rst2p, regulates transcription of the fission yeast *ste11⁺* gene, which encodes a pivotal transcription factor for sexual development. *Mol Biol Cell* 11(9): 3205-17.

Labbe S, Pena MM, Fernandes AR, Thiele DJ (1999) A copper-sensing transcription factor regulates iron uptake genes in *Schizosaccharomyces pombe*. *J Biol Chem* 274(51): 36252-60.

Labbe S, Thiele DJ (1999) Pipes and wiring: the regulation of copper uptake and distribution in yeast. *Trends Microbiol* 7(12): 500-5.

Labbe S, Zhu Z, Thiele DJ (1997) Copper-specific transcriptional repression of yeast genes encoding critical components in the copper transport pathway. *J Biol Chem* 272(25): 15951-8.

Lee MG, Nurse P (1987) Complementation used to clone a human homologue of the fission yeast cell cycle control gene *cdc2*. *Nature* 327(6117): 31-5.

Lehmann OJ, Sowden JC, Carlsson P, Jordan T, Bhattacharya SS (2003) Fox's in development and disease. *Trends Genet* 19(6): 339-44.

Lesch BJ, Page DC (2012) Genetics of germ cell development. *Nat Rev Genet* 13(11): 781-94.

Li P, McLeod M (1996) Molecular mimicry in development: identification of *ste11*⁺ as a substrate and *mei3*⁺ as a pseudosubstrate inhibitor of *ran1*⁺ kinase. *Cell* 87(5): 869-80.

Li Y, Lam KS, Dasgupta N, Ye P (2010) A yeast's eye view of mammalian reproduction: cross-species gene co-expression in meiotic prophase. *BMC Syst Biol* 4(125).

Lino Y, Yamamoto M (1985) Mutants of *Schizosaccharomyces pombe* which sporulate in the haploid state. *Mol Gen Genet* 198(3): 416-21.

Lodish HF, Darnell JE. Molecular cell biology. 4th ed. New York: W.H. Freeman; 2000. xxxix, 1084, G-17, p. p.I-36

Loidl J, Lorenz A (2009) Analysis of *Schizosaccharomyces pombe* meiosis by nuclear spreading. *Methods Mol Biol* 558(15-36).

Longhese MP, Foiani M, Muzi-Falconi M, Lucchini G, Plevani P (1998) DNA damage checkpoint in budding yeast. *EMBO J* 17(19): 5525-8.

Lowndes NF, McNerny CJ, Johnson AL, Fantes PA, Johnston LH (1992) Control of DNA synthesis genes in fission yeast by the cell-cycle gene *cdc10*⁺. *Nature* 355(6359): 449-53.

Maeda T, Mochizuki N, Yamamoto M (1990) Adenylyl cyclase is dispensable for vegetative cell growth in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87(20): 7814-8.

Maeda Y, Kashiwazaki J, Shimoda C, Nakamura T (2009) The *Schizosaccharomyces pombe* syntaxin 1 homolog, Psy1, is essential in the development of the forespore membrane. *Biosci Biotechnol Biochem* 73(2): 339-45.

Martin-Castellanos C, Blanco MA, de Prada JM, Moreno S (2000) The Puc1 cyclin regulates the G1 phase of the fission yeast cell cycle in response to cell size. *Mol Biol Cell* 11(2): 543-54.

Martin-Castellanos C, Labib K, Moreno S (1996) B-type cyclins regulate G1 progression in fission yeast in opposition to the p25^{rum1} cdk inhibitor. *EMBO J* 15(4): 839-49.

Mata J, Bahler J (2006) Global roles of Ste11p, cell type, and pheromone in the control of gene expression during early sexual differentiation in fission yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(42): 15517-22.

Mata J, Lyne R, Burns G, Bahler J (2002) The transcriptional program of meiosis and sporulation in fission yeast. *Nat Genet* 32(1): 143-7.

Mata J, Wilbrey A, Bahler J (2007) Transcriptional regulatory network for sexual differentiation in fission yeast. *Genome Biol* 8(10): R217.

Matsuyama A, Arai R, Yashiroda Y, Shirai A, Kamata A, Sekido S, *et al.* (2006) ORFeome cloning and global analysis of protein localization in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Nat Biotechnol* 24(7): 841-7.

McInerny CJ (2004) Cell cycle-regulated transcription in fission yeast. *Biochem Soc Trans* 32(Pt 6): 967-72.

McLeod M, Beach D (1988) A specific inhibitor of the *ran1*⁺ protein kinase regulates entry into meiosis in *Schizosaccharomyces pombe*. *Nature* 332(6164): 509-14.

McLeod M, Stein M, Beach D (1987) The product of the *mei3*⁺ gene, expressed under control of the mating-type locus, induces meiosis and sporulation in fission yeast. *EMBO J* 6(3): 729-36.

Merlini L, Dudin O, Martin SG (2013) Mate and fuse: how yeast cells do it. *Open Biol* 3(3): 130008.

Millar JB, Buck V, Wilkinson MG (1995) Pyp1 and Pyp2 PTPases dephosphorylate an osmosensing MAP kinase controlling cell size at division in fission yeast. *Genes Dev* 9(17): 2117-30.

Mitchison JM (1990) The fission yeast, *Schizosaccharomyces pombe*. *Bioessays* 12(4): 189-91.

Mitchison JM, Nurse P (1985) Growth in cell length in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *J Cell Sci* 75(357-76).

Mochizuki N, Yamamoto M (1992) Reduction in the intracellular cAMP level triggers initiation of sexual development in fission yeast. *Mol Gen Genet* 233(1-2): 17-24.

Moldon A, Malapeira J, Gabrielli N, Gogol M, Gomez-Escoda B, Ivanova T, *et al.* (2008) Promoter-driven splicing regulation in fission yeast. *Nature* 455(7215): 997-1000.

Mondesert O, McGowan CH, Russell P (1996) Cig2, a B-type cyclin, promotes the onset of S in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Cell Biol* 16(4): 1527-33.

Mukaiyama H, Kajiwarra S, Hosomi A, Giga-Hama Y, Tanaka N, Nakamura T, *et al.* (2009) Autophagy-deficient *Schizosaccharomyces pombe* mutants undergo partial sporulation during nitrogen starvation. *Microbiology* 155(Pt 12): 3816-26.

Mukaiyama H, Nakase M, Nakamura T, Kakinuma Y, Takegawa K (2010) Autophagy in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *FEBS Lett* 584(7): 1327-34.

Murakami-Tonami Y, Yamada-Namikawa C, Tochigi A, Hasegawa N, Kojima H, Kunitatsu M, *et al.* (2007) Mei4p coordinates the onset of meiosis I by regulating *cdc25*⁺ in fission yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(37): 14688-93.

Nakamura T, Abe H, Hirata A, Shimoda C (2004) ADAM family protein Mde10 is essential for development of spore envelopes in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Eukaryot Cell* 3(1): 27-39.

Nakamura T, Asakawa H, Nakase Y, Kashiwazaki J, Hiraoka Y, Shimoda C (2008) Live observation of forespore membrane formation in fission yeast. *Mol Biol Cell* 19(8): 3544-53.

Nakamura T, Kashiwazaki J, Shimoda C (2005) A fission yeast SNAP-25 homologue, SpSec9, is essential for cytokinesis and sporulation. *Cell Struct Funct* 30(2): 15-24.

Nakamura T, Nakamura-Kubo M, Hirata A, Shimoda C (2001) The *Schizosaccharomyces pombe spo3*⁺ gene is required for assembly of the forespore membrane and genetically interacts with *psy1*⁺-encoding syntaxin-like protein. *Mol Biol Cell* 12(12): 3955-72.

Nakase Y, Hirata A, Shimoda C, Nakamura T (2009) Ectopic overproduction of a sporulation-specific transcription factor induces assembly of prespore-like membranous compartments in vegetative cells of fission yeast. *Genetics* 183(3): 1195-9.

- Nakashima A, Hasegawa T, Mori S, Ueno M, Tanaka S, Ushimaru T, *et al.* (2006) A starvation-specific serine protease gene, *isp6⁺*, is involved in both autophagy and sexual development in *Schizosaccharomyces pombe*. *Curr Genet* 49(6): 403-13.
- Nasmyth K, Nurse P, Fraser RS (1979) The effect of cell mass on the cell cycle timing and duration of S-phase in fission yeast. *J Cell Sci* 39(215-33).
- Nasmyth KA (1979) A control acting over the initiation of DNA replication in the yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *J Cell Sci* 36(155-68).
- Nevitt T, Ohrvik H, Thiele DJ (2012) Charting the travels of copper in eukaryotes from yeast to mammals. *Biochim Biophys Acta* 1823(9): 1580-93.
- Norbury C, Nurse P (1992) Animal cell cycles and their control. *Annu Rev Biochem* 61(441-70).
- Nurse P (1975) Genetic control of cell size at cell division in yeast. *Nature* 256(5518): 547-51.
- Nurse P, Bissett Y (1981) Gene required in G1 for commitment to cell cycle and in G2 for control of mitosis in fission yeast. *Nature* 292(5823): 558-60.
- Nurse P, Thuriaux P, Nasmyth K (1976) Genetic control of the cell division cycle in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Gen Genet* 146(2): 167-78.
- Ohmiya R, Kato C, Yamada H, Aiba H, Mizuno T (1999) Isolation of multicopy suppressors of the calcium sensitivity of a mutant lacking the bZIP transcription factor Atf1 in fission yeast. *Mol Gen Genet* 261(2): 297-306.
- Okuzaki D, Satake W, Hirata A, Nojima H (2003) Fission yeast *meu14⁺* is required for proper nuclear division and accurate forespore membrane formation during meiosis II. *J Cell Sci* 116(Pt 13): 2721-35.
- Otsubo Y, Yamamoto M (2012) Signaling pathways for fission yeast sexual differentiation at a glance. *J Cell Sci* 125(Pt 12): 2789-93.
- Overdier DG, Porcella A, Costa RH (1994) The DNA-binding specificity of the hepatocyte nuclear factor 3/forkhead domain is influenced by amino-acid residues adjacent to the recognition helix. *Mol Cell Biol* 14(4): 2755-66.

Pataki E, Weisman R, Sipiczki M, Miklos I (2016) *fh11* gene of the fission yeast regulates transcription of meiotic genes and nitrogen starvation response, downstream of the TORC1 pathway. *Curr Genet*

Pesin JA, Orr-Weaver TL (2008) Regulation of APC/C activators in mitosis and meiosis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 24(475-99).

Pierrou S, Hellqvist M, Samuelsson L, Enerback S, Carlsson P (1994) Cloning and characterization of seven human forkhead proteins: binding site specificity and DNA bending. *EMBO J* 13(20): 5002-12.

Rees EM, Lee J, Thiele DJ (2004) Mobilization of intracellular copper stores by the Ctr2 vacuolar copper transporter. *J Biol Chem* 279(52): 54221-9.

Rees EM, Thiele DJ (2004) From aging to virulence: forging connections through the study of copper homeostasis in eukaryotic microorganisms. *Curr Opin Microbiol* 7(2): 175-84.

Reeves R (2001) Molecular biology of HMGA proteins: hubs of nuclear function. *Gene* 277(1-2): 63-81.

Reeves R, Nissen MS (1990) The A.T-DNA-binding domain of mammalian high mobility group I chromosomal proteins. A novel peptide motif for recognizing DNA structure. *J Biol Chem* 265(15): 8573-82.

Reiter W, Watt S, Dawson K, Lawrence CL, Bahler J, Jones N, *et al.* (2008) Fission yeast MAP kinase Sty1 is recruited to stress-induced genes. *J Biol Chem* 283(15): 9945-56.

Rhee HS, Pugh BF (2011) Comprehensive genome-wide protein-DNA interactions detected at single-nucleotide resolution. *Cell* 147(6): 1408-19.

Robinow CF (1977) The Number of Chromosomes in *SCHIZOSACCHAROMYCES POMBE*: Light Microscopy of Stained Preparations. *Genetics* 87(3): 491-7.

Rustici G, Mata J, Kivinen K, Lio P, Penkett CJ, Burns G, *et al.* (2004) Periodic gene expression program of the fission yeast cell cycle. *Nat Genet* 36(8): 809-17.

Sabatino SA, Forsburg SL (2010) Molecular genetics of *Schizosaccharomyces pombe*. *Methods Enzymol* 470(759-95).

Samejima I, Mackie S, Fantes PA (1997) Multiple modes of activation of the stress-responsive MAP kinase pathway in fission yeast. *EMBO J* 16(20): 6162-70.

Samejima I, Mackie S, Warbrick E, Weisman R, Fantes PA (1998) The fission yeast mitotic regulator *win1*⁺ encodes an MAP kinase kinase kinase that phosphorylates and activates Wis1 MAP kinase kinase in response to high osmolarity. *Mol Biol Cell* 9(8): 2325-35.

Scherthan H (2001) A bouquet makes ends meet. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2(8): 621-7.

Serpe M, Joshi A, Kosman DJ (1999) Structure-function analysis of the protein-binding domains of Mac1p, a copper-dependent transcriptional activator of copper uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 274(41): 29211-9.

Sgarra R, Rustighi A, Tessari MA, Di Bernardo J, Altamura S, Fusco A, *et al.* (2004) Nuclear phosphoproteins HMGA and their relationship with chromatin structure and cancer. *FEBS Lett* 574(1-3): 1-8.

Shichino Y, Yamashita A, Yamamoto M (2014) Meiotic long non-coding meiRNA accumulates as a dot at its genetic locus facilitated by Mmi1 and plays as a decoy to lure Mmi1. *Open Biol* 4(6): 140022.

Shigehisa A, Okuzaki D, Kasama T, Tohda H, Hirata A, Nojima H (2010) Mug28, a meiosis-specific protein of *Schizosaccharomyces pombe*, regulates spore wall formation. *Mol Biol Cell* 21(12): 1955-67.

Shimoda C (2004) Forespore membrane assembly in yeast: coordinating SPBs and membrane trafficking. *J Cell Sci* 117(Pt 3): 389-96.

Shimoda C, Hirata A, Kishida M, Hashida T, Tanaka K (1985) Characterization of meiosis-deficient mutants by electron microscopy and mapping of four essential genes in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Gen Genet* 200(2): 252-7.

Shiozaki K, Russell P (1995) Cell-cycle control linked to extracellular environment by MAP kinase pathway in fission yeast. *Nature* 378(6558): 739-43.

Simanis V, Nurse P (1986) The cell cycle control gene *cdc2*⁺ of fission yeast encodes a protein kinase potentially regulated by phosphorylation. *Cell* 45(2): 261-8.

- Smith AJ, Humphries SE (2009) Characterization of DNA-binding proteins using multiplexed competitor EMSA. *J Mol Biol* 385(3): 714-7.
- St-Andre O, Lemieux C, Perreault A, Lackner DH, Bahler J, Bachand F (2010) Negative regulation of meiotic gene expression by the nuclear poly(a)-binding protein in fission yeast. *J Biol Chem* 285(36): 27859-68.
- Staub C (2001) A century of research on mammalian male germ cell meiotic differentiation *in vitro*. *J Androl* 22(6): 911-26.
- Stern B, Nurse P (1996) A quantitative model for the *cdc2*⁺ control of S phase and mitosis in fission yeast. *Trends Genet* 12(9): 345-50.
- Stros M, Launholt D, Grasser KD (2007) The HMG-box: a versatile protein domain occurring in a wide variety of DNA-binding proteins. *Cell Mol Life Sci* 64(19-20): 2590-606.
- Sugimoto A, Iino Y, Maeda T, Watanabe Y, Yamamoto M (1991) *Schizosaccharomyces pombe ste11*⁺ encodes a transcription factor with an HMG motif that is a critical regulator of sexual development. *Genes Dev* 5(11): 1990-9.
- Sugiyama A, Tanaka K, Okazaki K, Nojima H, Okayama H (1994) A zinc finger protein controls the onset of premeiotic DNA synthesis of fission yeast in a Mei2-independent cascade. *EMBO J* 13(8): 1881-7.
- Sukegawa Y, Yamashita A, Yamamoto M (2011) The fission yeast stress-responsive MAPK pathway promotes meiosis via the phosphorylation of Pol II CTD in response to environmental and feedback cues. *PLoS Genet* 7(12): e1002387.
- Szilagyi Z, Batta G, Enczi K, Sipiczki M (2005) Characterisation of two novel fork-head gene homologues of *Schizosaccharomyces pombe*: their involvement in cell cycle and sexual differentiation. *Gene* 348(101-9).
- Tanaka K, Hirata A (1982) Ascospore development in the fission yeasts *Schizosaccharomyces pombe* and *S. japonicus*. *J Cell Sci* 56(263-79).
- Thiele DJ (1988) ACE1 regulates expression of the *Saccharomyces cerevisiae* metallothionein gene. *Mol Cell Biol* 8(7): 2745-52.

Thomas JO (2001) HMG1 and 2: architectural DNA-binding proteins. *Biochem Soc Trans* 29(Pt 4): 395-401.

Thorvaldsen JL, Sewell AK, Tanner AM, Peltier JM, Pickering IJ, George GN, *et al.* (1994) Mixed Cu^+ and Zn^{2+} coordination in the DNA-binding domain of the *AMT1* transcription factor from *Candida glabrata*. *Biochemistry* 33(32): 9566-77.

Turner RB, Smith DL, Zawrotny ME, Summers MF, Posewitz MC, Winge DR (1998) Solution structure of a zinc domain conserved in yeast copper-regulated transcription factors. *Nat Struct Biol* 5(7): 551-5.

Tuteja G, Kaestner KH (2007) SnapShot: forkhead transcription factors I. *Cell* 130(6): 1160.

Valbuena N, Moreno S (2010) TOR and PKA pathways synergize at the level of the Ste11 transcription factor to prevent mating and meiosis in fission yeast. *PLoS One* 5(7): e11514.

van Beest M, Dooijes D, van De Wetering M, Kjaerulff S, Bonvin A, Nielsen O, *et al.* (2000) Sequence-specific high mobility group box factors recognize 10-12-base pair minor groove motifs. *J Biol Chem* 275(35): 27266-73.

van Dam H, Castellazzi M (2001) Distinct roles of Jun : Fos and Jun : ATF dimers in oncogenesis. *Oncogene* 20(19): 2453-64.

Vermeulen K, Van Bockstaele DR, Berneman ZN (2003) The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell Prolif* 36(3): 131-49.

Watanabe Y, Lino Y, Furuhashi K, Shimoda C, Yamamoto M (1988) The *S.pombe mei2⁺* gene encoding a crucial molecule for commitment to meiosis is under the regulation of cAMP. *EMBO J* 7(3): 761-7.

Watanabe Y, Yamamoto M (1994) *S. pombe mei2⁺* encodes an RNA-binding protein essential for premeiotic DNA synthesis and meiosis I, which cooperates with a novel RNA species meiRNA. *Cell* 78(3): 487-98.

Watanabe Y, Yamamoto M (1996) *Schizosaccharomyces pombe pcr1⁺* encodes a CREB/ATF protein involved in regulation of gene expression for sexual development. *Mol Cell Biol* 16(2): 704-11.

White S, Khaliq F, Sotiriou S, McInerney CJ (2001) The role of DSC1 components *cdc10*⁺, *rep1*⁺ and *rep2*⁺ in MCB gene transcription at the mitotic G1-S boundary in fission yeast. *Curr Genet* 40(4): 251-9.

Whittaker RH (1969) New concepts of kingdoms or organisms. Evolutionary relations are better represented by new classifications than by the traditional two kingdoms. *Science* 163(3863): 150-60.

Winge DR (1998) Copper-regulatory domain involved in gene expression. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 58(165-95).

Winge DR, Jensen LT, Srinivasan C (1998) Metal-ion regulation of gene expression in yeast. *Curr Opin Chem Biol* 2(2): 216-21.

Woese CR, Fox GE (1977) Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74(11): 5088-90.

Wood V (2006) How to get the most from fission yeast genome data: a report from the 2006 European Fission Yeast Meeting computing workshop. *Yeast* 23(13): 905-12.

Wood V, Gwilliam R, Rajandream MA, Lyne M, Lyne R, Stewart A, *et al.* (2002) The genome sequence of *Schizosaccharomyces pombe*. *Nature* 415(6874): 871-80.

Xue-Franzen Y, Kjaerulff S, Holmberg C, Wright A, Nielsen O (2006) Genomewide identification of pheromone-targeted transcription in fission yeast. *BMC Genomics* 7(303).

Yamamoto M (1996) Regulation of meiosis in fission yeast. *Cell Struct Funct* 21(5): 431-6.

Yamamoto M (2010) The selective elimination of messenger RNA underlies the mitosis-meiosis switch in fission yeast. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* 86(8): 788-97.

Yamamoto TG, Chikashige Y, Ozoe F, Kawamukai M, Hiraoka Y (2004) Activation of the pheromone-responsive MAP kinase drives haploid cells to undergo ectopic meiosis with normal telomere clustering and sister chromatid segregation in fission yeast. *J Cell Sci* 117(Pt 17): 3875-86.

Yamanaka S, Yamashita A, Harigaya Y, Iwata R, Yamamoto M (2010) Importance of polyadenylation in the selective elimination of meiotic mRNAs in growing *S. pombe* cells. EMBO J 29(13): 2173-81.

Yamashita A, Shichino Y, Tanaka H, Hiriart E, Touat-Todeschini L, Vavasseur A, *et al.* (2012) Hexanucleotide motifs mediate recruitment of the RNA elimination machinery to silent meiotic genes. Open Biol 2(3): 120014.

Yu H (2007) Cdc20: a WD40 activator for a cell cycle degradation machine. Mol Cell 27(1): 3-16.

Zaret KS, Carroll JS (2011) Pioneer transcription factors: establishing competence for gene expression. Genes Dev 25(21): 2227-41.

Zhou H, Thiele DJ (2001) Identification of a novel high affinity copper transport complex in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. J Biol Chem 276(23): 20529-35.

Zhou PB, Thiele DJ (1991) Isolation of a metal-activated transcription factor gene from *Candida glabrata* by complementation in *Saccharomyces cerevisiae*. Proc Natl Acad Sci U S A 88(14): 6112-6.